



Bachelorarbeit

Herr
Jens Grühne

**Eisenabhängige Suberin- und
Cumarinsynthese in *Arabidopsis
thaliana* und *Nicotiana tabacum***

Mittweida, 2017

Bachelorarbeit

Eisenabhängige Suberin- und Cumarinsynthese in *Arabidopsis* *thaliana* und *Nicotiana tabacum*

Autor:

Herr

Jens Gruhne

Studiengang:

Biotechnologie

Seminargruppe:

BT14wM-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

PD Dr. Hans-Peter Mock

weitere Betreuer:

Prof. Dr. Nicolaus von Wirén

Einreichung:

Mittweida, 04.08.2017

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2017

Bibliographische Beschreibung:

Gruhne, Jens: Eisenabhängige Suberin- und Cumarinsynthese in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* - 2017. - 71 Seiten, 45 Seiten Inhalt, 4 Seiten Anhänge

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2017

Englischer Titel

Suberin- and Coumarin Synthesis in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* under iron deficiency

Kurzbeschreibung

Die Aminosäure Phenylalanin wird in vielen sekundären Stoffwechselwegen benötigt, so auch im Phenylpropanoid Stoffwechselweg. Feruloyl-CoA ist eines dieser Stoffe des Phenylpropanoid Stoffwechselwegs. Aus Feruloyl-CoA können unter anderem Cumarine und Suberin gebildet werden. Da beide Stoffe aus Feruloyl-CoA synthetisiert werden können wurden die Synthesewege dieser Stoffe auf Kompetitivität untersucht. Die Cumarinanalyse wurde an *Nicotiana tabacum* Zellkulturen und deren Medien mittels HPLC, Dünnschichtchromatographie und fotometrischen Messungen durchgeführt. Die Cumarine wurden über phenolische Extraktion aus den Zellen gewonnen, während die Cumarine aus den Medien durch Festphasenextraktion isoliert wurden. Suberin wurde an *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia und *Arabidopsis thaliana* Mutante Feruloyl-CoA 6'-hydroxylase, durch Anfärben des Suberins am Konfokalmikroskop untersucht. *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* wurden auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien kultiviert. Eine Erhöhte Bildung an Scopoletin und Scopolin konnte unter Eisenmangel nachgewiesen werden. Beide Organismen der Suberinanalyse wiesen eine unverändert starke Synthese auf, es wurden nur Änderungen im Suberinisierungsmuster beobachtet. Somit hat sich die Hypothese, dass es unter Eisenmangel zu einer geringeren Synthese von Suberin durch erhöhte Cumarinsynthese kommt, nicht bestätigt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers für das Betreuen dieser Bachelorarbeit seitens der Hochschule Mittweida bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Hans-Peter Mock und Prof. Dr. Nicolaus von Wirén herzlich für die Betreuung und die Möglichkeit am IPK Gatersleben eine Bachelorarbeit anzufertigen bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Elena Barthel, Dr. Rircardo Fabiano Giehl und Sara Naseri für die Unterstützung im Labor bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Gruppen Angewandte Biochemie (ABC) und Molekulare Pflanzenernährung (MPE) für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungen	VIII
1 Einleitung	1
Einleitung	1
1.1 Eisen	1
1.1.1 Eisenaufnahme	1
1.2 Synthese aromatischer Aminosäuren	2
1.2.1 Phenylalanin synthese	3
1.3 Cumarine	4
1.4 Suberin	5
2 Material	7
2.1 Chemikalien	7
2.2 Geräte	9
2.3 Lösungen	12
2.4 Organismen	12
3 Zielstellung	13
4 Methoden	14
4.1 Kultivieren von <i>Col-0</i> , <i>f6'h1-1</i> und <i>S2LS3</i>	14
4.2 Festphasenextraktion	14
4.3 Phenolische Extraktion	15
4.4 Fotometrische Messung	15
4.5 Dünnschichtchromatographie	15
4.6 HPLC	15
4.7 Anfärben des Suberin	16
4.8 Mikroskopie	16
4.9 Einteilung der Wurzel nach Suberinisierungsgrad	17
5 Ergebnisse	18
5.1 Analyse des Cumaringehalt der <i>S2LS3</i> -Medien	18
5.2 Analyse des Cumaringehalt der <i>S2LS3</i> -Zellen	33
5.3 Mikroskopie	34
6 Diskussion	39
6.1 Mehr Cumarine durch Eisenmangel	39
6.2 Problematik der Cumarinanalyse	39
6.3 Unverändert starke Suberinsynthese	41
6.4 Problematik der Suberinanalyse	41
7 Zusammenfassung	43

8 Ausblick	44
Selbstständigkeitserklärung	45
Anhang	51
Anhang 1 Tabellen	51
Anhang 2 Signifikanztests	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Gradienten HPLC-Läufe	16
Tabelle 2	hkvjfgjv	51
Tabelle 3	Messwerte des Cumaringehaltes aller ausgewerteten Medien pro ml Medium	52
Tabelle 4	Messwerte des Cumaringehaltes aller ausgewerteten Medien pro mg Frisch- gewischt Zellen	52
Tabelle 5	Suberinverteilung der Wurzeln von <i>Col-0</i> und <i>f6'h1-1</i> , ermittelt über die Zellzahl jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 60 beziehungsweise (bzw.) 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 60 bzw. 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde.	53
Tabelle 6	Suberinverteilung der Wurzeln von <i>Col-0</i> und <i>f6'h1-1</i> , ermittelt über die berechnete Fläche jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 60 bzw. 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 60 bzw. 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzu- gegeben wurde.	53
Tabelle 7	Suberinverteilung der Wurzeln von <i>Col-0</i> und <i>f6'h1-1</i> , ermittelt über die mitt- lere Intensität jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 60 bzw. 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 60 bzw. 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde.	53
Tabelle 8	Suberinverteilung der Wurzeln von <i>Col-0</i> und <i>f6'h1-1</i> , ermittelt über die Zell- zahl jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde; Wurzeln wurden vor dem Färben mit Fluorol-Yellow nach Eismangelerscheinungen vorselektiert.	54
Tabelle 9	Suberinverteilung der Wurzeln von <i>Col-0</i> und <i>f6'h1-1</i> , ermittelt über die berechnete Fläche jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde; Wurzeln wurden vor dem Färben mit Fluorol-Yellow nach Eismangelerschei- nungen vorselektiert.	54
Tabelle 10	Suberinverteilung der Wurzeln von <i>Col-0</i> und <i>f6'h1-1</i> , ermittelt über die mittlere Intensität jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde; Wurzeln wurden vor dem Färben mit Fluorol-Yellow nach Eismangelerschei- nungen vorselektiert.	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Syntheseweg des Cumarins Scopoletin/Scopolin	4
Abbildung 2	Schemabild zur Einteilung der <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Col-0</i> und <i>f6'h1-1</i>) Wurzeln nach dem Suberinisierungsgrad.	17
Abbildung 3	10x 10 cm HPTLC Platte mit je 10 μ l 1000, 200, 100, 50 und 10 μ g/ μ l Scopoletin in Methanol, nach 15 Minute (min.) mit einem Laufmittel aus Ethylacetat und n-Heptan (6:4) betrachtet unter VIS (links) und unter UV (rechts).	18
Abbildung 4	10x 10 cm HPTLC Platte mit je 10 μ l eines 5, 2, 1 und 0,5 μ g/ μ l Scopoletinstandard in Methanol (Banden 1 bis 4) und den Eluaten 1 bis 5 in den Banden 5 bis 9, betrachtet unter VIS (links) und UV (rechts); Als Laufmittel wurde Ethylacetat und n-Heptan (6:4) verwendet und der Lauf dauerte 15 Minuten.	19
Abbildung 5	10x 10 cm HPTLC Platte 1 mit 5, 10, 20 und 50 μ g/ μ l Scopoletin (Position 1 bis 4), Medium in Position 5, Eluate 1, 2, 3 und 4 in den Positionen 6 bis 9, betrachtet unter VIS (links), UV (mittig) und auf dem Transiluminator (rechts) nach einem 15 minütigem Lauf mit Ethylacetat und n-Heptan (6:4); Jede Bande enthielt 10 μ l der jeweiligen Lösung. . .	19
Abbildung 6	10x 10 cm HPTLC Platte 2 mit 5, 10, 20 und 50 μ g/ μ l Scopoletin (Positi- on 1 bis 4), mit Scopoletin enthaltendem Medium in Position 5, Durchlauf in den Positionen 6 und den Waschfraktionen in Positionen 7 und 8, betrachtet unter VIS (links), UV (mittig) und auf dem Transiluminator (rechts) nach einem 15 minütigem Lauf mit Ethylacetat und n-Heptan (6:4); Jede Bande enthielt 10 μ l der jeweiligen Lösung.	20
Abbildung 7	Linearer Bereich von Scopoletin unter Messung der Absorption im Platten- fotometer bei 280 und 320 nm.	21
Abbildung 8	Linearer Bereich von Scopoletin unter Messung der Fluoreszenz im Plattenfotometer bei 336 nm Anregung und 438 nm Emission.	21
Abbildung 9	Linearer Bereich von Scopoletin unter Messung der Fluoreszenz im Plattenfotometer bei 336 nm Anregung und 438 nm Emission.	22
Abbildung 10	Linearer Bereich mit Nachweisgrenze von Scopoletin unter Messung der Fluoreszenz im Plattenfotometer bei 336 nm Anregung und 438 nm Emission.	22
Abbildung 11	Chromatogrammausschnitt zwischen 3 und 6 Minuten von Scopolin- und Scopoletin Standards, gemessen wurde die Emission (EU) bei 438 nm nach der Anregung bei 336 nm.	23
Abbildung 12	Inhalte der einzelnen Festphasenfraktionen in Scopoletin; Zum Beladen wurden 10 μ g Scopoletinstandard benutzt, äquilibriert wurde mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und Methanol (9:1) und gewaschen mit 10 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser; Gemessen wurde die Fluoreszenz am Plattenfotometer bei 438 nm nach einer Anregung bei 336 nm; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	23

Abbildung 13	Übersicht Scopoletingehalt des Mediums, mit 1 μg Scopoletin, nach der Festphasenextraktion, gemessen im Plattenfotometer bei einer Anregung von 336 nm und einer Emission bei 438 nm; Zum Beladen wurden 10 μg Scopoletinstandard benutzt, äquilibriert wurde mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und Methanol (9:1) und gewaschen mit 10 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	24
Abbildung 14	Übersicht Scopoletingehalt des Mediums, mit 1 μg Scopoletin, nach der Festphasenextraktion, gemessen im Plattenfotometer bei einer Anregung von 336 nm und einer Emission bei 438 nm; Zum Beladen wurden 10 μg Scopoletinstandard benutzt, äquilibriert wurde mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und 2% Methanol und gewaschen mit 10 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	25
Abbildung 15	Unterschied zwischen Scopoletinstandards in Methanol und 0,1% Ameisensäure in Wasser, gemessen bei einer Emission von 438 nm nach der Anregung bei 336 nm.	26
Abbildung 16	Scopoletingehalt der einzelnen Fraktionen der Festphase, durchgeführt nach dem optimierten Protokoll, bei einer Anregung von 336 nm und Emission bei 438 nm im Fotometer; Es wurden 10 μg Scopoletin dem Medium zugegeben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	26
Abbildung 17	Darstellung des Scopoletingehaltes in den einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion der 1:10 verdünnten Medien, mit 10 μg Scopoletin enthaltenden Medien, welche sich durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ergaben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	27
Abbildung 18	Scopoletingehalt in μg jeder Lösung der Festphasenextraktion, eines Scopoletin-Rutin-Chlorogensäure Gemischs, bei der Messung der Fluoreszenz (Anregung: 336 nm und Emission: 438 nm); Alle vier ml wurden in eine Fraktion aufgefangen und vor der Messung 1:10 verdünnt.	27
Abbildung 19	Scopoletingehalt der Fraktionen der Festphasenextraktion des Gemischs aus Scopoletin, Chlorogensäure und Rutin, detektiert durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).	28
Abbildung 20	Fraktionen nach der Festphasenextraktion, der Medien nach Zellabtrennung, nach dem optimierten Protokoll, gemessen bei Ex: 336 nm und Em: 438 nm; Die Medien wurden vor und die Eluate nach der Festphasenextraktion 1:10 verdünnt; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst; Die Messung erfolgte über das Plattenfotometer.	28
Abbildung 21	Darstellung des Scopoletingehaltes in den einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion der 1:10 verdünnten Medien, welche sich durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ergaben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	29
Abbildung 22	Darstellung des Scopolingehaltes in den einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion der 1:10 verdünnten Medien, welche sich durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ergaben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	29

Abbildung 23	Verlust an Scopolin durch Filtration der Fraktionen der Festphasenextraktionen, durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ermittelt; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	30
Abbildung 24	Verlust an Scopoletin durch Filtration der Fraktionen der Festphasenextraktionen, durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ermittelt; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.	30
Abbildung 25	Filtration eines durch Zellabtrennung erhaltenen Mediums durch Nylonfilter der Porengröße 20, 1,2 und 0,45 μm nach jedem Filtrationsschritt, Scopolin und Scopoletin durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) gemessen.	31
Abbildung 26	Ausschnitt von 3 bis 6 Minuten des Chromatogramms der +Fe und -Fe Medien nach Zentrifugation, ermittelt durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).	31
Abbildung 27	Mittelwerte mit Standardabweichung in pg/ml Medium an Scopolin und Scopoletin der Medien, gemessen über die Fluoreszenz in der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).	32
Abbildung 28	Mittelwerte mit Standardabweichung in pg/ml Medium an Scopolin und Scopoletin der Medien, gemessen über die Fluoreszenz in der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).	32
Abbildung 29	Ausschnitt von 3 bis 6 Minuten des Chromatogramms der S2LS3-Zellen auf +Fe und -Fe Medien erhalten durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).	33
Abbildung 30	Anteil Scopolin und Scopoletin in 100 mg S2LS3 Zellen (Frischgewicht), erhalten durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).	33
Abbildung 31	Mittelwerte mit Standardabweichung in pg/mg Frischgewisch an Scopolin und Scopoletin in S2LS3-Zellen, die auf eisenhaltigem und eisenarmen Medium wuchsen, gemessen über die Fluoreszenz in der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).	34
Abbildung 32	Verteilung des Suberins im <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des ersten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien als Mikroskopaufnahmen (oben) und als Diagramme (unten); Eisenmangel wurde durch 60 μl (-Fe 60) bzw. 90 μl (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für die abgebildeten Wurzeln erfolgte keine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Mikroskopaufnahmen wurden mit Zeiss LSM 780 zwischen 493 und 578 nm gemessen; Maßstabsbalken entspricht 200 μm ; Messwerte wurden über die mittlere Intensität bestimmt.	35
Abbildung 33	Verteilung des Suberins im <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des ersten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μl (-Fe 60) bzw. 90 μl (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte keine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die berechnete Fläche ermittelt.	36

Abbildung 34	Verteilung des Suberins im <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des ersten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μ l (-Fe 60) bzw. 90 μ l (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte keine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die Zellzahl ermittelt.	36
Abbildung 35	Verteilung des Suberins im <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des zweiten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien als Mikroskopaufnahmen (oben) und als Diagramme (unten); Eisenmangel wurde durch 90 μ l (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für die abgebildeten Wurzeln erfolgte eine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Mikroskopaufnahmen wurden mit Zeiss LSM 780 zwischen 493 und 578 nm gemessen; Maßstabsbalken entspricht 200 μ m; Messwerte wurden über die mittlere Intensität bestimmt.	37
Abbildung 36	Verteilung des Suberins im <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des zweiten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μ l (-Fe 60) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte eine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die berechnete Fläche ermittelt.	38
Abbildung 37	Verteilung des Suberins im <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des zweiten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μ l (-Fe 60) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte eine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die Zellzahl ermittelt.	38

Abkürzungen

+Fe eisenhaltig

-Fe 60 schwacher Eisenmangel

-Fe 90 starker Eisenmangel

4CL Cumarinsäure-CoA Ligase

Abb. Abbildung

ADH Arogenat Dehydrogenase

ADT Arogenat Dehydratase

ATP Adenosintriphosphat

bzw. beziehungsweise

C3H Cumarinsäure 4'-Hydroxylase 5-O-(4-Cumarinsäure)-D-Chinat/Shikimisäure 3'-Hydroxylase

C4H Cumarinsäure 4'-Hydroxylase

ca. *circa*

CM Chorisminsäure Mutase

Col-0 Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia

COMT Kaffeesäure-O-methyltransferase

CS Chorisminsäure Synthase

DAHP 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat 7-Phosphat

DHCS 3-Dehydrochinat Synthase

DHD 3-Dehydrochinat Dehydratase

E4P D-Erythrose 4-Phosphat

EPSP 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat

F6'H1 Feruloyl-CoA-ortho-hydroxylase 1

f6'h1-1 *Arabidopsis thaliana* Mutante Feruloyl-CoA 6'-hydroxylase

HPP 4-Hydroxyphenylpyruvat

HPPAT 4-Hydroxyphenylpyruvat Aminotransferase

KCS β -ketoalkyl-CoA Synthase

min. Minute

PAL Phenylalanin-Ammoniak-Lyase

PAT Prephenat Aminotransferase

PDH Prephenat Dehydrogenase

PDT Prephenat Dehydratase

PEP Phosphoenolpyruvat

Phe Phenylalanin

PPAT Phenylpyruvat Aminotransferase

SDH Shikimat Dehydrogenase

SK Shikimat Kinase

TAL Tyrosin-Ammoniak-Lyase

Trp Tryptophan

Tyr Tyrosin

UpM Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Eisen

Eisen ist ein wichtiges Spurenelement für viele Organismen (Jeong & Guerinot, 2009). Es kann in Pflanzen verschiedene Auswirkungen haben. Einige dieser Auswirkungen können sein: Verminderte Chlorophyllsynthese und somit auch verminderte Photosyntheseleistungen, veränderte Synthese von Aminosäuren, Purinen, Phytohormonen und Koenzymen. Auch veränderte Schwefel- und Stickstoffassimilationsfähigkeit, sowie Auswirkungen auf die DNA in Form von verändert starker -Replikation, -Reparatur und -Transkription werden durch Eisen beeinflusst (Balk & Pilon, 2011; Petit et al., 2001; Briat et al., 2007). In der Photosynthese und der Atmungskette spielt der Eisengehalt eine wichtige Rolle, da der Elektronentransport durch die Membranen von Eisen(II)sulfid-Cluster beeinträchtigt wird. Dadurch können folgende Enzyme oder Enzymkomplexe beeinträchtigt werden: Cytochrom b_6f , Photosystem I und Ferredoxin (Balk & Pilon, 2011). Unter Eisenmangel leidende Pflanzen haben oft, aufgrund eines Mangels an Chlorophyll, gelbliche Blätter. Dieser Zustand der Pflanze nennt man Chlorose. Die Wirkung auf die DNA Replikation, -Reperatur und -Transkription lässt sich auf die Wirkung von Eisen(II)sulfid-Cluster auf die RNA Polymerase zurückführen, denn es zeigte sich in den Experimenten von Hirata et al. (2008), dass die RNA Polymerase und die DNA Primase von Archaeen eine, wahrscheinlich für die Struktur wichtige, Bindungsstelle für Eisen(II)sulfid-Cluster besitzt. Des Weiteren gibt es auch Gene deren Promotor durch Eisen eine Induktion oder Repression erfahren. Ein solches Gen ist das Feritin-Gen vom Mais, es erfährt durch Eisenmangel eine Repression (Petit et al., 2001).

1.1.1 Eisenaufnahme

Das Halten der Eisenkonzentration in einem bestimmten Bereich, Homöostase, ist notwendig um Chlorose zu vermeiden. Bei gut belüfteten Böden mit leicht saurem bis leicht basischem pH-Wert liegt Eisen meist als Eisenphosphat oder Eisenhydroxid vor und ist somit für die Pflanzen nicht mehr verfügbar. In Abhängigkeit der Pflanzenart, grasartig oder nicht grasartig, und dem pH-Wert werden zwei Mechanismen zur erleichterten Aufnahme von Eisen benutzt. Die nicht grasartigen Pflanzen benutzen einen auf Reduktion des Eisens basierenden Mechanismus, Strategie I genannt. In diesem Mechanismus wird Fe^{3+} durch Abgabe von Protonen in die Rizosphäre zu Fe^{2+} reduziert und somit leichter für die Pflanze zugänglich gemacht. Der Protonentransport erfolgt häufig durch die Protonen-transportierende ATPase. Über die Eisen komplexierende Reduktase II, die an der Plasmamembran lokalisiert ist, wird das Eisen (Fe^{3+}) reduziert und somit der Pflanze zugänglich gemacht, dieser Vorgang wird unter Anwesenheit einer hohen Kalziumkonzentration gehemmt. Ein sehr hoher pH-Wert und eine hohe Konzentration von Bikarbonaten führt zur Repression der Strategie I, weshalb es zusätzlich neben der Sekretion von Protonen zur Sekretion von verschiedenen organischen Verbindungen, wie phenolhaltige Verbindungen, organische Säuren, Zuckern und Flavonoiden kommen kann.

Grasartige Pflanzen sekretieren Siderophore, Eisen bindende Proteine, in die Rizosphäre um Eisen aufzunehmen, diesen Mechanismus wird Strategie II genannt. Dieser kommt, im Gegensatz zur Strategie I, ohne reduktive Schritte aus, wodurch Fe^{3+} und nicht Fe^{2+} aufgenommen wird. Grasartige Pflanzen können diesen Mechanismus auch unter hohen Kalziumkonzentrationen und hohem pH-Wert nutzen, da diese nicht auf die Eisen komplexierende Reduktase II angewiesen sind (Römheld, 1987; Kobayashi & Nishizawa, 2012; Kim & Guerinot, 2007; Schmid et al., 2014; Jeong & Guerinot, 2009).

1.2 Synthese aromatischer Aminosäuren

Die Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) ist für Pflanzen von entscheidender Bedeutung, da diese Aminosäuren als Ausgangsstoff für viele sekundäre Metabolite dienen. So kann zum Beispiel Trp in verschiedene Alkaloide oder Indole umgesetzt werden. Tyrosin kann zur Herstellung von isoquinolin Alkaloiden, Betalaine und Chinone verwendet werden. Phe kann zu Flavonoiden, kondensierte Tannine, Lignin, Lignanen sowie flüchtige Phenylpropanoide und flüchtige Benzenoide umgewandelt werden. Ausgangsstoff für Phe, Tyr und Trp ist das Chorismat, das im Shikimat-Syntheseweg produziert wird. Die Existenz des Shikimat-Synthesewegs konnte in Bakterien, Pilzen und Pflanzen nachgewiesen werden (Srinivasan et al., 1956; Herrmann, 1995). Der Syntheseweg des Chorimats erfolgt in sieben aufeinander folgenden Reaktionen, die als Ausgangsstoffe D-Erythrose 4-Phosphat (E4P), aus der Pentose-Phosphat Synthese und Phosphoenolpyruvat (PEP), aus der Glykolyse, haben. Alle sieben Reaktionen finden innerhalb von Plastiden statt (Maeda & Dudareva, 2012). Das Enzym 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat 7-Phosphat (DAHP) Synthase kondensiert E4P und PEP zu DAHP, einem Aldol. Um diese Reaktion ausführen zu können benötigt das Enzym ein zweiwertiges Ion, entweder Mangan (Mn^{2+}) oder Cobalt (Co^{2+}). In Samen von *Vigna radiata* [L.] Wilczek zeigte sich, dass es zwei Isozyme von DAHP Synthasen gibt, ein Isozym das Mangan bevorzugt und eines das Cobalt bevorzugt. Die DAHP, die Cobalt bevorzugt braucht dieses Ion um die Reaktion zu starten, wohingegen die Mangan bevorzugende DAHP Synthase die Reaktion auch ohne Mangan starten kann (Rubin & Jensen, 1985). Dieses Enzym kann durch aromatische Aminosäuren allosterisch gehemmt werden (Maeda & Dudareva, 2012). Die Reaktion von DAHP zu 3-Dehydrochinat erfolgt durch die 3-Dehydrochinat Synthase (DHCS). Die Reaktion benötigt Cobalt (Co^{2+}), da dieses Enzym ein Metalloenzym ist, zusätzlich wird noch NAD^+ benötigt. DHCS katalysiert folgende Reaktionen ohne Zwischenprodukte: Alkoholoxidation, Carbonylreduktion, β -Eliminierung organischen Phosphats, Ringöffnung und intermolekulare Indolkondensation. Der dritte Schritt im Shikimat-Syntheseweg ist die Umwandlung von DHCS in 3-Dehydroshikimat, dies erfolgt durch die 3-Dehydrochinat Dehydratase (DHD). Im vierten Schritt wird durch die Shikimat Dehydrogenase (SDH) aus 3-Dehydroshikimat, unter Verbrauch von NADPH, Shikimat synthetisiert. Eine zehnfach höhere Aktivität von SDH gegenüber DHD wurde durch Mousdale & Coggins (1985) in *Pisum sativum* L. festgestellt. In höheren Pflanzen werden die Schritte drei und vier durch einen Komplex aus DHD und SDH zusammengefasst (Maeda & Dudareva, 2012). Die Phosphorylierung von Shikimat zu Shikimat 3-Phosphat wird durch das Enzym Shikimat Kinase (SK) durchgeführt (Maeda & Dudareva, 2012). Für diese Reaktion benötigt das Enzym sowohl Adenosintriphosphat (ATP), als Kosubstrat (Schmidt et al., 1990), als auch ein divalentes Ion. Koshiba (1979) fand heraus, dass neben dem nativ vorkommenden Enzym im Komplex mit Magnesium (Mg^{2+}) auch ein aktives Enzym mit Mangan, Cobalt, Calcium, Cadmium, Zink, Eisen, Kupfer oder Nickel als Ligand vorliegen kann. Es wird vermutet, dass das Metallion für die dreidimensionale Struktur des Enzyms sehr wichtig ist, da in allen Metallkomplexen außer mit Magnesium, Mangan, Cadmium, oder Cobalt eine Enzymaktivität kleiner als 73% beobachtet wurde. Im nächsten Schritt wird an das Shikimat 3-Phosphat eine Enolpyruvyl-Gruppe angehängt und zu 5-Enolpyruvylshikimat 3-Phosphat (EPSP), dies geschieht durch die EPSP Synthase. Das benötigte Enolpyruvat wird durch ein weiteres Molekül PEP bereitgestellt. Diese angehängte Seitengruppe wird entweder in der Phe- und Tyr-Synthese modifiziert oder im Trp Syntheseweg wieder entfernt (Maeda & Dudareva, 2012). Schönbrunn et al. (2001) entdeckte, dass das Enzym eine Konformationsänderung, zu seiner aktiven Form, erst durch das Binden des Substrates Shikimat 3-Phosphat erfährt. Der siebte und letzte Schritt des Shikimat-Syntheseweges, bei dem Chorisminsäure entsteht, ist eine anti-Eliminationsreaktion, bei der sowohl das Phosphat am 3'C-Atom des 5-Enolpyruvylshikimat

3-Phosphat als auch ein Wasserstoffatom durch die Chorisminsäure Synthase (CS) abgespalten werden. In dieser Reaktion wird eine weitere Doppelbindung erzeugt (Maeda & Dudareva, 2012). Das Enzym benötigt als Koenzym Flavinmononucleotide, welche als Elektronendonoren dienen, um die Phosphat-Gruppe abspalten zu können (Macheroux et al., 1999).

1.2.1 Phenylalanin synthese

Die erste Reaktion geschieht durch die Chorisminsäure Mutase (CM), bei der Chorisminsäure zu Prephenat umgewandelt wird. Es gibt drei Isoenzyme der CM, CM-1, CM-2 und eine nur in *Arabidopsis thaliana* gefundene CM-3 (Benesova & Bode, 1992; Mobley et al., 1999; Eberhard et al., 1996). Eine verminderte Aktivität der CM-1 und CM-3 in Plastiden konnte unter Anwesenheit von Phe und Tyr festgestellt werden. Des Weiteren ließ sich eine induzierende Wirkung durch Elictooren, die bei Befall von Pathogenen ausgeschüttet werden, feststellen (Benesova & Bode, 1992; Mobley et al., 1999). Die Aktivität der CM-2 ist laut Benesova & Bode (1992) drei mal so groß, wie die der CM-1. CM-3 soll eine ähnliche Aktivität wie CM-1 besitzen. Im Zytosol wurde kaum Chorisminsäure gefunden, das lässt sich auf das Fehlen der allosterischen Regulation durch Phe und Tyr und das Fehlen des Plastidpeptids zurückführen, dies wurde auch von Mobley et al. (1999) bestätigt. Sowohl die allosterische Regulation, als auch ein Plastidpeptid wurde bei CM-1 und CM-3 gefunden (Mobley et al., 1999). Es existieren sowohl zur Phe-synthese als auch zur Tyr-synthese zwei Wege, einer davon führt immer über Arogenat und der Andere entweder über 4-Hydroxyphenylpyruvat für Tyr oder über Phenylpyruvat für Phe. In Pflanze stellte man fest, dass die Synthese von Phe und Tyr bevorzugt über die Bildung von Arogenat abläuft (Maeda et al., 2010). Der bevorzugte Syntheseweg, über Arogenat, zu Phe erfolgt durch die Arogenat Dehydratase (ADT) und für Tyr durch die Arogenat Dehydrogenase (ADH). Der alternative Syntheseweg für Phe, basierend auf Prephenat, besteht aus den Reaktionen der Phenylpyruvat Aminotransferase (PPAT) und Prephenat Dehydratase (PDT), während der alternative Tyrosinsyntheseweg auf den Reaktionen der Prephenat Dehydrogenase (PDH) und 4-Hydroxyphenylpyruvat Aminotransferase (HPPAT) beruht. Prephenat kann also von drei Enzymen als Substrat genutzt werden, diese sind PDT, PDH und Prephenat Aminotransferase (PAT). Die PDT dekarboxyliert und dehydratisiert Prephenat zu Phenylpyruvat, dies geschieht in saurer Umgebung (Zamir et al., 1983). Es wurde festgestellt, dass PDT zwei Domänen besitzt, eine N-terminale katalytische Domäne und eine C-terminale Domäne, wodurch das Enzym allosterisch durch Phe reguliert werden kann (Kleeb et al., 2006). Cho et al. (2007) und Yamada et al. (2008) konnten zeigen, dass Arogenat als Substrat gegenüber Prephenat vorgezogen wird. Phenylpyruvat kann dann durch die PPAT in Phe umgewandelt werden, da dies eine Aminierungsreaktion ist wird Glutamat als Donor einer Aminogruppe benötigt. Als Koenzym für diese Reaktion wird Pyridoxalphosphat benötigt. Auch diese Reaktion ist reversibel. Falls zu wenig Glutamat vorliegt kann das Glutamat durch Tyr ersetzt werden, wodurch allerdings nicht α -Ketoglutarat sondern 4-Hydroxyphenylpyruvat (HPP) entsteht (Bonner & Jensen, 1985). Die erste Reaktion im bevorzugten Syntheseweg von Phe und Tyr ist die Übertragung einer Aminogruppe von L-Glutamat oder L-Aspartat auf Prephenat (Bonner & Jensen, 1985; Maeda & Dudareva, 2012). Diese Reaktion geschieht sowohl in Richtung von Arogenat als auch Prephenat, doch wird die Reaktion zu Arogenat bevorzugt, dies zeigt sich in der zehnfach höheren Affinität zu Prephenat gegenüber Arogenat (Maeda et al., 2010). Die Synthese von Phe aus Arogenat geschieht durch die Arogenat ADT, dabei wird das Substrat unter niedrigem pH-Wert decarboxyliert und dehydratisiert (Maeda & Dudareva, 2012; Zamir et al., 1983). In *Arabidopsis thaliana* kann dieses Enzym auch Prephenat umsetzen (Maeda et al., 2010). Die oxidative Decarboxylierung von Arogenat zu Tyr geschieht, in Plastiden (Rippert & Matringe, 2002; Polley, 1978) mittels ADH. Für diese Reaktion benötigt die ADH NADP⁺ oder NAD⁺ als

Kofaktor (Stenmark et al., 1974; Rippert & Matringe, 2002). Rippert & Matringe (2002), Byng et al. (1981) und Connelly & Conn (1986) stellten eine Hemmung der ADH durch Tyrosin fest. Stenmark et al. (1974) und Rippert & Matringe (2002) konnten zeigen, dass in Pflanzen NADP^+ als Kofaktor verwendet wird, eine Ausnahme dieser Regel gilt für Mais, der NAD^+ benötigt Byng et al. (1981). In *Arabidopsis thaliana* wurden zwei Isozyme der ADH gefunden. ADH1 zeigte eine hohe Substrataffinität gegenüber Arogenat, wohingegen ADH2 weniger substratspezifisch Arogenat als auch Prephenat umsetzen kann. Die Umsetzung von Arogenat wird bevorzugt, da die Aktivitätsmessung von ADH2 mit Prephenat ungefähr vier mal geringer waren als die Aktivität mit Arogenat (Rippert & Matringe, 2002). Genau wie ADH benötigt PDH in Pflanzen NADP^+ als Kofaktor (Rippert & Matringe, 2002) und wird durch Tyr inhibiert (Rippert & Matringe, 2002; Byng et al., 1981; Connelly & Conn, 1986). Dieses Enzym wandelt Prephenat in HPP um und ist somit die erste Reaktion im alternativen, nicht bevorzugten, Weg zur Herstellung von Tyr aus Prephenat. Die zweite Reaktion dieses Weges ist die Aminierung von HPP. Die Aminogruppe wird von Glutamat übertragen und zu α -Ketoglutarat (Maeda & Dudareva, 2012).

1.3 Cumarine

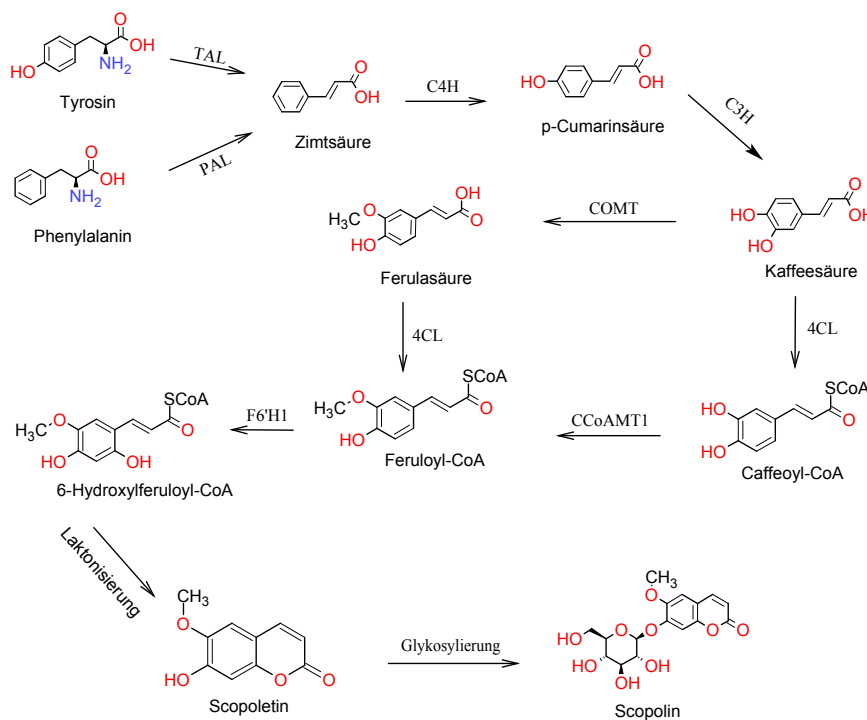


Abbildung 1: Syntheseweg des Cumarins Scopoletin/Scopolin

Cumarine sind eine große Gruppe an sekundären Metaboliten vorkommend in Pflanzen, Bakterien und manchen Pilzen (Gnonlonfin et al., 2012). In Pflanzen können sie eine hormonartige, antioxidative (Kostova, 2006) oder Abwehrfunktionen haben (Wink, 2003). Viele Cumarine werden von Pflanzen in den Boden abgegeben, um die Aufnahme von Metallen, wie Eisen zu erleichtern oder zu ermöglichen, da diese zum Beispiel Eisen(III) binden können (Schmid et al., 2014). Die Synthese von verschiedenen Cumarinen wird meist durch Befall von Pathogenen oder abiotischem Stress induziert (Gnonlonfin et al., 2012; Wink, 2003). Viele Cumarine können auch als Phytoalexine bezeichnet werden, da sie auch eine antibakterielle Wirkung haben können (Yang

et al., 2010; Kai et al., 2008). Alle Cumarine lassen sich aufgrund ihrer, von der Grundstruktur des 2H-1-Benzopyran-2-on abweichenden, Struktur in einfache Cumarine, am siebten C-Atom oxidierte Cumarine, Pyranocumaine und Phenylcumarine unterteilen (Estbvez-Braun & Gonzalez, 1997; Bourgaud et al., 2006; Gnonlonfin et al., 2012). Alle Cumarine werden durch ortho-hydroxylierung, cis-trans-Isomerisation der Seitenkette und dem Ringschluss, auch Laktonisierung genannt, im Phenylpropanoid Syntheseweg hergestellt und können anschließend durch Kopplung an einen Zucker in der Vakuole gespeichert werden (Kai et al., 2008; Taguchi et al., 2000; Gestetner & Conn, 1974). Je nach Art, ausgesetztem Stress und Cumarin können die Synthesewege variieren, deshalb wird hier als repräsentativer Syntheseweg der des Scopoletin und seines Glykosids Scopolin erläutert, da es in Experimenten oft in hohen Konzentrationen gefunden wurde (Uritani, 1999; Buschmann et al., 2000). In der Synthese des Scopoletins bzw. Scopolin sind hauptsächlich sechs Enzyme beteiligt. Das erste Enzym dieser Synthesekette ist die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), die Phenylalanin deaminiert und somit zur Zimtsäure umwandelt (Russell, 1961). Um katalytisch aktiv sein zu können braucht PAL 5-Methylen-1,5-dihydro-4H-imidazol-4-on als prostetische Gruppe. Da 5-Methylen-1,5-dihydro-4H-imidazol-4-on als Antioxidant bekannt ist, vermutet man eine Deaminierung durch Oxidation der S-H-Gruppe von PAL (Vogt, 2010; Kostova, 2006). Des Weiteren konnte Russell (1961) zeigen, dass der Ersatz des Histidin an Position 89 aus PAL eine Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL) machte. Das Enzym Cumarinsäure 4'-Hydroxylase (C4H), eine Cytochrom P450 Oxidoreduktase, wandelt Zimtsäure in 3-(4-Hydroxyphenyl)acrylsäure um, auch Cumarinsäure genannt (Vogt, 2010). Als Cytochrom P450 Oxidoreduktase braucht dieses Enzym molekularen Sauerstoff, NADPH und 2-Mercaptoethanol, als Ersatz für NADPH kann auch NADH dienen. C4H erfährt durch Kohlenstoffmonoxid eine reversible Hemmung (Russell, 1961). Außerdem ist es ein entscheidendes Enzym der Ligninsynthese, wie Sykes et al. (2015) zeigte. Anschließend wird Cumarinsäure in Kaffeesäure umgewandelt, dies geschieht durch Cumarinsäure 4'-Hydroxylase 5-O-(4-Cumarinsäure)-D-Chinat/Shikimisäure 3'-Hydroxylase (C3H). Ähnlich, wie C4H erfährt dieses Enzym durch Kohlenstoffmonoxid eine reversible Hemmung und wirkt sich durch eine Reduktion der Aktivität negativ auf die Ligninsynthese aus (Whetten & Sederoff, 1995; Sykes et al., 2015). Kaffeesäure-O-methyltransferase (COMT) methyliert die 3'-Hydroxylgruppe der Kaffeesäure, daraus entsteht Ferulasäure (Ye et al., 1994). Die Cumarinsäure-CoA Ligase (4CL) hat mehrere Substrate, wie zum Beispiel Zimtsäure, p-Cumarinsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure. 4CL wandelt unter Wasserabspaltung die Karboxylgruppe der Ferulasäure in eine CoA-Thioester-Gruppe um, das Produkt nennt sich Feruloyl-CoA (Liu et al., 2017). Feruloyl-CoA wird durch Feruloyl-CoA-ortho-hydroxylase 1 (F6'H1) hydroxyliert und zum Ausgangsstoff für Scopoletin und Scopolin, 6'-Hydroxylferuloyl-CoA genannt (Kai et al., 2006, 2008). Vor der Laktonisierung geschieht die cis-trans-Isomerisation dieser Stoffe, dies kann durch UV-Licht passieren, doch wird auch eine Isomerase basierte Reaktion vermutet (Bayoumi et al., 2008). Es existieren noch mehrere Möglichkeiten Scopoletin und Scopolin zu bilden, dieser Weg scheint der Favorisierte zu sein (Kai et al., 2006, 2008; Bayoumi et al., 2008; Gnonlonfin et al., 2012).

1.4 Suberin

Suberin ist ein Polymer bestehend aus einer aliphatischen und einer aromatischen Einheit, vorkommend meist in der Endodermis, dem Periderm oder im Casparischen Streifen von Pflanzen (Pollard et al., 2008). Dort hält Suberin Wasser und Ionen zurück (Franke & Schreiber, 2007; Enstone et al., 2002), wodurch der passive Wasserfluss Richtung Blatt ermöglicht wird. Die aromatische Einheit dient als Verankerung (Bernards, 2002) in der primären Zellwand (Franke et al., 2005), während die aliphatische, lamellenartige Einheit aufgrund ihrer Hydrophobizität Wasser und Ionen zurückhält (Pollard et al., 2008; Beisson et al., 2012). Suberinlamellen bestehen meist aus langkettigen Alkoho-

len, Fettsäuren, wie ω -Hydroxysäure, Polyhydroxysäuren, Epoxysäuren und α -, ω -Dicarboxylsäuren (Pollard et al., 2008), die über eine Glycerinesterbindung an die aromatische Einheit gebunden sind. In der aromatischen Einheit wurden viele Hydroxyzimtsäure Monomere gefunden (Bernards, 2002; Delude et al., 2016). Die Suberinsynthese kann durch Verletzung der Pflanze, Salzstress als auch Befall durch pathogene Organismen verändert werden (Pollard et al., 2008). Die Suberinisierung der Zellen startet nicht von altem Gewebe (Sproß) zum neuen Gewebe (Wurzelspitze), sondern nach einer zufälligen Verteilung. Durch diese zufällige Verteilung entsteht anfangs ein lückenhafter Bereich, der im Laufe der Zeit vervollständigt wird. Aus diesem Muster der Suberinisierung entstehen drei Bereiche, der nicht suberinisierte Teil (Wurzelspitze), der teil suberinisierte Bereich und der voll suberinisierte Bereich (Sproß). Barberon et al. (2016) konnte nachweisen, dass die Größe dieser Bereiche und die Menge angelagerten Suberins durch Salzstress verändert wird. Der Mangel an Eisen- und Mangan-Ionen resultierte in einer Erhöhung des nicht- und teil suberinisierten Bereichs und einer Verringerung der Suberinintensität. Das genaue Gegenteil konnte unter Kalium- und Schwefel-Mangel gezeigt werden. Im Eisenmangelexperiment von Barberon et al. (2016) wurde auch ein Abbau des Suberins im vollständig suberinisierten Bereich festgestellt, das auf eine verändert Ethylensynthese zurückzuführen war. Der vollständige Syntheseweg des Suberins ist noch nicht bekannt (Bernards, 2002), weshalb hier nur Teile der Synthese und darin involvierte Proteine aufgezeigt werden. Bekannt ist allerdings, dass diese auf der Fettsäuresynthese, sowie der Elongation und Oxidation (Franke & Schreiber, 2007) der daraus entstandenen Produkte und der Synthese der primären Zellwand beruht (Bernards, 2002). Somit spielt der Gehalt an PEP, Pyruvat und E4P eine wichtige Rolle, da diese Edukte vieler sekundären Metabolite sind. Die Elongation der Fettsäuren wird durch Fettsäure Elongasen ermöglicht. Die Oxidation der Fettsäuren ist abhängig von NADPH, da diese durch CYP86, ein Cytochrom P450 Enzym, (Wellesen et al., 2001) katalysiert wird (Franke & Schreiber, 2007). CYP86A1 und B1 sind am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Höfer et al., 2008; Compagnon et al., 2009). In *Arabidopsis thaliana* wird vermutet, dass die Oxidoreduktasen HOTHEAD (Kurdyukov et al., 2006) und CYP86A2 (Molina et al., 2008) auf die Oxidation der Fettsäuren Einfluss haben. Zum Beispiel zeigte sich, dass eine Knock-out Mutante des CYP86A33 eine veränderte Lamellenstruktur aufwies, das auf die Reduktion der Dicarbonsäuren und ω -Hydroxysäuren zurückzuführen war (Serra et al., 2009). ω -Hydroxyfettsäure und Fettalkohol Hydroxycinnamoyl Transferasen haben Einfluss auf die Menge an primären Ferulylestern, wodurch zwar die Struktur gleich bleibt die Menge an gebildetem Suberin aber sinkt (Serra et al., 2010; Molina et al., 2008; Beisson et al., 2012). Von Beisson et al. (2007) wurde gezeigt, dass die Bindung von Fettsäuren an Glycerin durch Glycerin-3-Phosphat Alkyl-CoA Alkyltransferasen erfolgt und somit entscheidend für den Zusammenbau von Suberin ist. Auch β -ketoalkyl-CoA Synthase (KCS), in *Arabidopsis thaliana* KCS2 und KCS20, sind in der Suberinsynthese involviert, das zeigten Franke et al. (2009) und Lee et al. (2009). Weiterhin ist unbekannt, ob der Zusammenbau des Suberins intrazellulär oder extrazellulär stattfindet (Beisson et al., 2012).

2 Material

2.1 Chemikalien

2-Aminoethyl diphenylborinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 91625 Schnelldorf, Deutschland
2-Morpholinoethansulfonsäure	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt , Deutschland
Agarose	Becton, Dickson und Company, 69126 Heidelberg, Deutschland
Ameisensäure	Avantor Performance Materials B.V., 7418AM Deventer, Niederlande
Anilin Blau	Polysciences Europe GmbH, 69493 Hirschberg an der Bergstrasse, Deutschland
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Chlorogensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Fluka Chemie Ag, Buchs, Schweiz
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat	Th. Geyer GmbH & Co. KG, 71272 Renningen, Deutschland
Ferrozin	Serva Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg, Deutschland
Fluorol Yellow 088	Santa Cruz Biotechnology Inc., 69115 Heidelberg, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide Kryotechnik GmbH, 40235 Düsseldorf, Deutschland
H_3BO_3	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland

Inositol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland
KH_2PO_4	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
KI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland
Kinetin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland
KNO_3	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
MgSO_4	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Milchsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 91625 Schnellendorf, Deutschland
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	Fluka Chemie Ag, Buchs, Schweiz
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
MS ohne Mn ohne Fe	DUSchweizFA BIOSchweizMIE B.V, 2003 RV Haarlem, Niederlande
MS ohne Vitamine	DUSchweizFA BIOSchweizMIE B.V, 2003 RV Haarlem, Niederlande
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Ferak Berlin GmbH, 12055 Berlin, Deutschland
NAA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland
NH_4NO_3	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
n-Heptan	Th. Geyer GmbH & Co. KG,

	71272 Renningen, Deutschland
Rutin x 3H ₂ O	Alfa Aesar GmbH & Co KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	DUSchweizFA BIOSchweizMIE B.V, 2003 RV Haarlem, Niederlande
Scopoletin Reag. DAB	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Thiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland

2.2 Geräte

6 Well Zellkulturplatte	Corning GmbH, 65189 Wiesbaden, Deutschland
ACQUITY UPLC System	Waters GmbH, 65760 Eschborn, Deutschland
Chromafil PET 6 ml Porengröße 0,45 µm	Machery-Nagel GmbH & Co.KG, 52355 Düren, Deutschland
Chromafix C18 SPE Kartusche	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, 52313 Düren, Deutschland
Deckgläser	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Fast Prep 120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, 02451 MA, USA
Horizontale Entwicklungskammer 2	CAMAG, 12169 Berlin, Deutschland
HPTLC-Platte 10x 10 cm 60 Kieselgel F ₂₅₄	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

Innoa 44	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
Miracloth	VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland
Nylon Net Filters 0,45/ 1,2 und 60 µm	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Peqlab imaging system	
Percival Intellus	CLF Plant Climatics GmbH, 86637 Wertingen, Deutschland
RCT basis	IKA-Werke GmbH & CO. KG, 79219 Staufen, Deutschland
Reusable Bottle Top Filter Unit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, 02451 MA, USA
RIMAX-Mühlperlen ZrO ₂ 1,0-1,2 mm	Mühlmeier GmbH & Co.KG, 95671 Bärnau, Deutschland
Röhre 13 ml	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, 51588 Nümbrecht, Deutschland
Screw neck vial 12x 32 mm Glass	Waters GmbH, 65760 Eschborn, Deutschland
Spectra Max Gemini	Molecular Devises Germany GmbH, 88400 Biberach an der Riss, Deutschland
Spectra Max Plus	Molecular Devises Germany GmbH, 88400 Biberach an der Riss, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
TLC Kieselgel 60 F ₂₅₄ Aluminium 10 x 20 cm	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
TLC Kieselgel 60 F ₂₅₄ Glas 10 x 20 cm	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland

UV-Star microplate 96 well	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, 79112 Freiburg, Deutschland
vertikale TLC Kammer	Biostep GmbH, 09235 Burkhardtsdorf, Deutschland
Zeiss LSM 780	Carl Zeiss Microscopy GmbH, 07745 Jena, Deutschland
ACQUITY UPLC Systeme bestehend aus	Binary Solvent Manager, Sample Manager, Column Manager, PDA e λ Detector und FLR Detector

2.3 Lösungen

Vitaminlösung aus Thiamin (0,004% w/v) und Inositol (1% w/v)

MnCl₂ x 4H₂O als 50 mM Stocklösung

Ferrozin als 25 mM Stocklösung

2-Morpholinoethansulfonsäure als 500 mM Stocklösung mit pH von 5,5

CoCl₂ x 6H₂O, CuSO₄ x 5H₂O, H₃BO₃, KI, Na₂MoO₄ x 2H₂O als Stocklösung der Konzentration 1 mg/ml

Salzlösung für Eisenmangel Zellkulturmedium als 100x Stocklösung besteht aus Murashige & Skoog Medium ohne Vitamine ohne FeNaEDTA

2.4 Organismen

Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia

Arabidopsis thaliana Mutante Feruloyl-CoA 6'-hydroxylase

Nicotiana tabacum L. cv. Havana 425 (S2LS3)

3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es die Synthese von Cumarinen und Suberin auf Kompetitivität zueinander zu untersuchen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Cumarinanalysen auch an Tabak-Zellkulturen möglich waren. Die Cumarinsynthese wurde in *Nicotiana tabacum* Zellkulturen unter eisenhaltigen und eisenarmen Bedingungen untersucht. Während die Untersuchung auf Veränderungen im Suberin in *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia und *Arabidopsis thaliana* Mutante *f6'h1-1* auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien erfolgte.

4 Methoden

4.1 Kultivieren von *Col-0*, *f6'h1-1* und *S2LS3*

S2LS3 wurde als Suspensions-Zellkultur in eisenhaltigen und eisenarmen Medium für sieben Tage bei 85 Umdrehungen pro Minute (UpM), 25 °C und einer Lichtintensität von 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{sec}$ kultiviert. Das eisenarme Medium wurden selbst hergestellt und enthielt alle Inhaltsstoffe des Murashige & Skoog Medium ohne Vitamine, mit Ausnahme des FeNaEDTA, während Murashige & Skoog Medium ohne Vitamine als eisenhaltiges Medium verwendet wurde. Beiden Medien wurde 0,5 % (v/v) Vitaminlösung hinzugefügt und der pH-Wert auf 6,0 eingestellt. Beiden Medien wurden unter sterilen Bedingungen 200 μl NAA und 30 μl Kinetin pro 100 ml Medium zugegeben, um Infektionen zu vermeiden und das Wachstum der Kulturen zu beschleunigen. Es wurden pro biologischem Replikat drei Kulturen auf eisenarmen und eisenhaltigem Medium zum Analysieren, je eine Sicherheitskultur und vier Kulturen auf eisenhaltigem Medium zum Beimpfen des nächsten biologischen Replikats angesetzt. Am siebten Tag wurden die Zellen der Analyseulturen durch Vakuumfiltration mit Miracloth vom Medium getrennt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Mit Ethanol und Triton X-100 sterilisierte Samen von *Col-0* und *f6'h1-1* wurden auf eisenhaltigen und eisenarmen Agarplatten ausgesät und senkrecht bei einer Lichtintensität von 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{sec}$ für sieben Tage inkubiert. Eisenhaltiges Medium enthielt Murashige & Skoog Medium (1/2 Konzentration) und eisenarmes Medium enthielt Murashige & Skoog Medium ohne Mn und Fe (1/2 Konzentration), dem 0,18 % (v/v) MnCl_2 und ein zuvor auf pH 5,5 eingestellter MES Puffer hinzugegeben wurden. Um den Effekt des Eisenmangels zu verstärken wurde den eisenarmen Medien 1,5 und 3 mmol Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben.

4.2 Festphasenextraktion

Durch die Festphasenextraktion sollten die Cumarine aus den Medien isoliert und in den Eluaten konzentriert werden, um sie dann im Fotometer, der HPLC oder durch Dünnschichtchromatographie quantitativ auszuwerten. Um den Verlust an Scopoletin durch die Festphasenextraktion zu bestimmen wurde ein Scopoletinstandard, ein mit Scopoletin versetztes Medium, Scopoletin in einem Gemisch aus Scopoletin, Rutin und Chlorogensäure im Medium und Medium, erhalten durch das Abtrennen der *S2LS3*-Zellen, getestet. Gleichzeitig wurde das angewendete Protokoll für eine bessere Rückgewinnungsrate optimiert. Das durch Abtrennen der Zellen erhaltene Medium wies nach dem Auftauen einen gelben Niederschlag auf, weshalb es auf 50 ml mit Millipore-Wasser aufgefüllt und in einer Zentrifuge mit Swing-out Rotor 30 min. bei 4200 UpM und 4 °C zentrifugiert wurde. Nach dem Konditionieren und Äquilibrieren wurde die C18-Kartusche mit dem durch Zentrifugation erhaltene Überstand beladen, gewaschen und mit Methanol eluiert. Die C18-Kartuschen wurden mehrfach verwendet. Neue Kartuschen wurden mit 10 ml und schon benutzte Kartuschen mit 20 ml Methanol konditioniert. Die Äquilibrierung mit 2% Methanol und 0,1% Ameisensäure in Wasser benutzter Kartuschen erfolgte mit 25 ml und für unbenutzte Kartuschen mit 20 ml der Äquilibrierlösung. Nach dem Beladen der Kartusche folgten zwei Waschschrte mit je 5 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser. Eluiert wurde mit 4 ml Methanol, sodass sich vier 1 ml Fraktionen ergaben. Es wurden bei jeder Festphasenextraktion die Durchläufe vom Beladen, Waschen und Eluieren aufgefangen.

4.3 Phenolische Extraktion

Ziel der phenolischen Extraktion war es die Zellen aufzuschließen und die Cumarine zu extrahieren. Die durch Abtrennung des Mediums erhaltenen Zellen wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und je zwei Fraktionen zu *circa* (ca.) 100 mg eingewogen. Auf 100 mg Zellen wurden 400 µl Methanol und ein paar ZrO₂ Mahlkugeln gegeben. Die Proben wurden anschließend zweimal für 45 Sekunden bei 5000 UpM in der Fast Prep gemahlen. Nach den ersten 45 Sekunden kühlten die Proben für ca. 1 min. ab. Anschließend wurden die Proben 10 min. bei 28.500 x g und 4 °C Zentrifugiert und der Überstand entnommen. Wieder wurde auf 100 mg Zellen 400 µl Methanol hinzugegeben und erneut unter gleichen Bedingungen Zentrifugiert. Der aus der zweiten Zentrifugation erhaltene Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt.

4.4 Fotometrische Messung

Lösungen der Festphasenextraktionen wurde mit Spectra Max Plus, auf Absorption bei 280 und 320 nm und mit Spectra Max Gemini auf Fluoreszenz nach Anregung bei 336 nm und Emission bei 438 nm untersucht. Um die statistische Sicherheit der Ergebnisse jeder Messung zu gewährleisten wurden immer Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt. Scopoletin wurde aufgrund seiner Autofluoreszenz immer im Spectra Max Gemini, während Chlorogensäure und Rutin auf Absorption bei 280 nm untersucht wurden.

4.5 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde verwendet um Fraktionen der Festphasenextraktion qualitativ und quantitativ auszuwerten, da diese Methode schnelle Ergebnisse liefert und einfach anzuwenden ist. Es wurden Scopoletinhaltige Proben und Standards auf die HPTLC Platten aufgebracht. Alle Scopoletinproben wurden auf horizontale 10x 10 cm 60 Kieselgel F₂₅₄ HPTLC-Platten auf Glas aufgetragen. Scopoletin wurde sowohl in Methanol, als auch in 0,1% Ameisensäure gelöst aufgetragen. Als Laufmittel wurden Mischungen aus Ethylacetat und n-Heptan im Verhältnis 6 zu 4 verwendet. Es wurden je 10 µl Probe aufgetragen. Zur Bandendetektion wurden ein Transiluminator, eine UV Lampe mit 254 und 365 nm Wellenlänge des Peqlab imagin Systems benutzt. Im Programm Quantum Capt wurden Aufnahmen der Platten gemacht und nach Intensität der Banden untersucht, diese Daten wurden dann mittels Excel ausgewertet.

4.6 HPLC

Die HPLC wurde aufgrund ihrer sehr geringen Nachweisgrenze, ihrer starken Trennung einzelner Proben und ihrer hohen Genauigkeit zur Analyse der Fraktionen aus den Festphasenextraktionen und den Proben aus der phenolischen Extraktion verwendet. Jede Lösung wurde im Verhältnis 4:1 mit 0,1% Ameisensäure in Wasser gemischt. Die Proben der phenolischen Extraktion wurden vor dem Mischen mit 0,1% Ameisensäure in Wasser 10 min. bei 13.500 UpM und 4 °C Zentrifugiert und 1:5 verdünnt. Nach dem Mischen mit 0,1% Ameisensäure in Wasser wurden die Proben 10 min. bei 13.500 UpM und 4 °C Zentrifugiert und der Überstand in der HPLC analysiert. Jeder HPLC-Lauf wurde bei 35 °C und den Säulen ACQUITY UPLC Van Guard Pre-column 1,7 µm, 5x 2,1 mm als Vorsäule und ACQUITY UPLC BEH Phenyl 1,7 µm, 100x 2,1 mm ausgeführt. Gemessen wurden mittels PDA die Wellenlängen 210 bis 800 nm und die Fluoreszenz auf Kanal 1 bei 300 nm Anregung und 400 nm Emission, während auf Kanal 2 mit 336 nm angeregt und bei 438 nm gemessen wurde. Benutzt wurden Laufmittel A (Millipore-Wasser mit 0,14% Ameisensäure)

und Laufmittel B (Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure). Der Anfangsgradient von 100% an Laufmittel A, wurde nach 10 min. durch 60 % Laufmittel A und 40 % B ersetzt. Der Gradient änderte sich alle 90 Sekunden von 0% auf 40%, 97%, 97%, 0% und 0% Laufmittel B (Tabelle 1).

Gradient	Zeit [min]	Durchfluss	Anteil Laufmittel A [%]	Anteil Laufmittel B [%]
1	Start	0,5	100	0
2	10	0,5	60	40
3	11,5	0,5	3	97
4	13	0,5	3	97
5	13,5	0,5	100	0
6	15	0,5	100	0

Tabelle 1: Gradienten HPLC-Läufe

4.7 Anfärben des Suberin

Um die Veränderung der Suberinisierung zu untersuchen wurden die sieben Tage auf eisenhaltigem und eisenmangel Medien gewachsenen *Arabidopsis thaliana* mit Fluorol Yellow gefärbt und mit Anilin-Blau gegengefärbt. Für die Fluorol Yellow Färbung wurde 0,01% (w/v) Fluorol Yellow in Milchsäure gelöst und für 30 min. bei 70 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal mit Millipore-Wasser für je 5 min. gewaschen. Zum Gegenfärben wurden die Pflanzen 30 min. in Dunkelheit bei Raumtemperatur mit 0,5% (w/v) Anilin-Blau in Wasser inkubiert und dreimal nach je 10 min. mit Millipore-Wasser gewaschen. Die fertig gefärbten Pflanzen wurden vom Spross befreit und mit Wasser auf einen Objektträger aufgebracht. Um zu verhindern, dass das Wasser zu schnell verdunstet wurde jeder Objektträger versiegelt.

4.8 Mikroskopie

Die Pflanzen auf den Objektträgern wurden am Konfokalmikroskop Zeiss LSM 780 unter 10 facher Vergrößerung betrachtet. Fluorol Yellow wurde mit 488 nm angeregt und gemessen zwischen 493 und 578 nm, da die Emissionswellenlänge 536 nm beträgt.

4.9 Einteilung der Wurzel nach Suberinisierungsgrad

Zur Unterteilung der Wurzeln in die drei Bereiche nicht-, teil- und voll suberiniert wurden die Fluoreszenzaufnahmen des Konfokalmikroskops benutzt. Diese drei Bereiche wurden bei jeder Wurzel mit Hilfe der Software Zen Blue ermittelt. Als Grundlage der Ergebnisse dienten die Fläche, Zellzahl und die Intensität des Suberins der jeweiligen Bereiche. Fläche und Intensität wurden bestimmt, indem jeder Bereich der Wurzel eingrahmt wurde. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Zählen, da dies im Fluoreszenzkanal (Kanal A) nicht ohne weiteres möglich war geschah dies im Kanal B, der die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt. Viele der Wurzeln wiesen Drehungen auf, wodurch das Zählen der Zellen erschwert wurde, weshalb Zellbanden gezählt wurden. Diese Zellbanden bestehen aus benachbarten Zellen, die den gleichen Abstand zur Wurzelspitze oder wahlweise zum Spross hatten. Der Bereich vom Spross (angefangen ab der ersten Seitenwurzel) bis zur ersten fehlenden suberinierten Zelle in der Endodermis wurde als voll suberiniert bezeichnet. Ausgehend vom Ende des voll suberinierten Bereichs bis zur letzten, ohne Änderung der Gamma- oder Helligkeitswerte, sichtbaren suberinierten Zelle wurde als teil suberiniert bezeichnet. Der nicht suberinierte Bereich erstreckte sich vom Ende des teil suberinierten Bereichs bis zur letzten Zelle der Elongationszone.

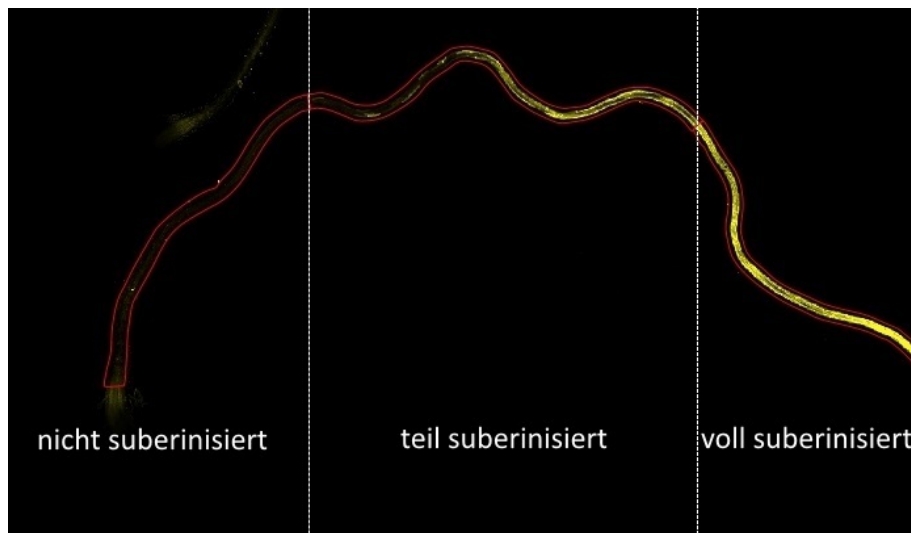


Abbildung 2: Schemabild zur Einteilung der *Arabidopsis thaliana* (*Col-0* und *f6'h1-1*) Wurzeln nach dem Suberinisierungsgrad.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse des Cumaringehalt der S2LS3-Medien

Es wurde versucht mittels Dünnschichtchromatographie den Gehalt an Cumarinen der Medien zu bestimmen. Bevor versucht wurde die Medien zu analysieren wurden je $10\ \mu\text{l}$ eines Scopoletinstandards der Konzentrationen 1000, 200, 50 und $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgetragen, um zu testen ob eine Mischung aus Ethylacetat und n-Heptan (6:4) als Laufmittel im Wandern der Banden resultiert. Nach etwa 15 Minuten wurde die Dünnschichtplatte aus der Kammer entfernt und unter sichtbarem und UV-Licht betrachtet. Alle Konzentrationen waren als Banden erkennbar. Auch war eine Abnahme der Intensität und Dicke der Banden zu verzeichnen, dies zeigte sich in einer sehr dünnen und schwachen $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Bande. Aus den Zurückgelegten Strecken konnte ein R_f -Wert von 0,35 ermittelt werden (siehe Abbildung (Abb.) 3).

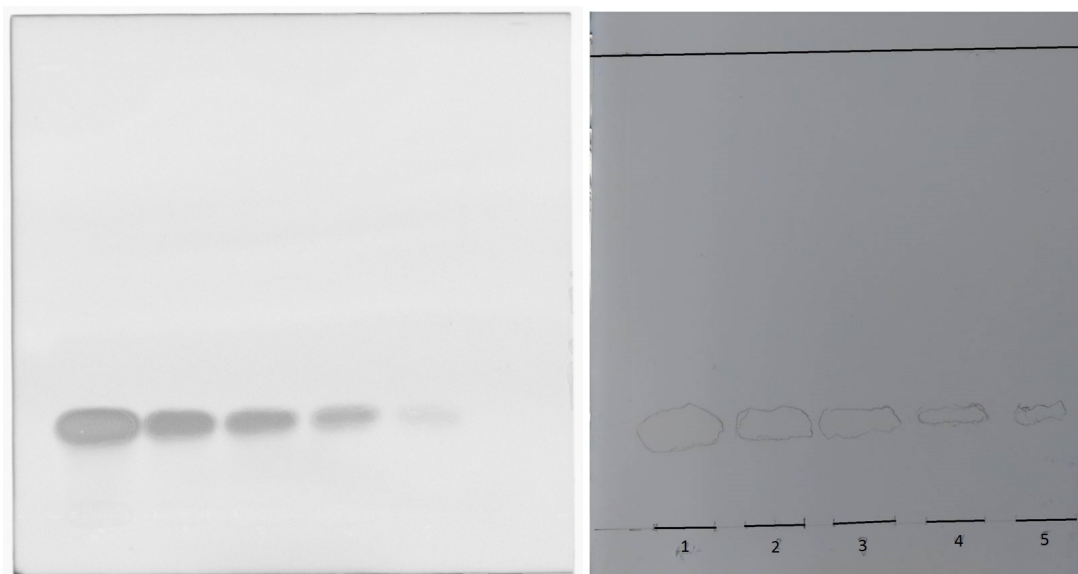


Abbildung 3: 10x 10 cm HPTLC Platte mit je $10\ \mu\text{l}$ 1000, 200, 100, 50 und $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Scopoletin in Methanol, nach 15 min. mit einem Laufmittel aus Ethylacetat und n-Heptan (6:4) betrachtet unter VIS (links) und unter UV (rechts).

Anschließend wurden die Eluate einer Festphasenextraktion analysiert. In der Festphasenextraktion wurde ein Medium untersucht, welchem vorher Scopoletin beigemischt wurde. Da ein Wandern der Banden bei Ethylacetat und n-Heptan (6:4) als Laufmittel zu verzeichnen war wurde dieses weiterhin verwendet. Die Banden 1 bis 4 wurden mit Scopoletinstandards der Konzentrationen 5, 2, 1 und $0,5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, in dieser Reihenfolge, beladen (Abb. 4). Die Banden 5 bis 9 wurden mit den vier Eluat beladen. Jede Bande enthielt $10\ \mu\text{l}$ der jeweiligen Lösung. Nach ca 15 min. wurde die Platte unter dem Peqlab imaging system untersucht. Jedoch konnten keine Banden detektiert werden, wodurch auch kein R_f -Wert bestimmt werden konnte.

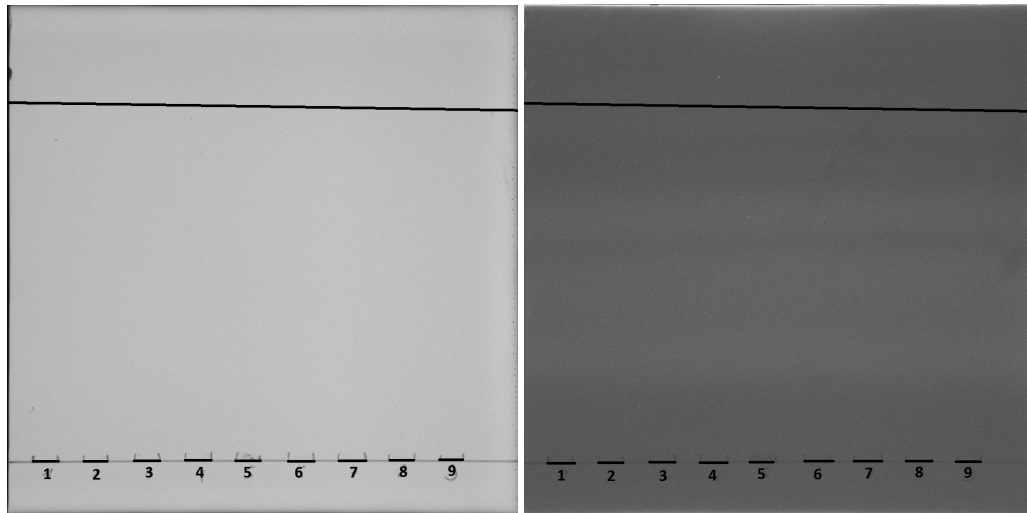


Abbildung 4: 10x 10 cm HPTLC Platte mit je 10 μl eines 5, 2, 1 und 0,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Scopoletinstandard in Methanol (Banden 1 bis 4) und den Eluaten 1 bis 5 in den Banden 5 bis 9, betrachtet unter VIS (links) und UV (rechts); Als Laufmittel wurde Ethylacetat und n-Heptan (6:4) verwendet und der Lauf dauerte 15 Minuten.

Im nächsten Experiment wurden alle Fraktionen einer Festphasenextraktion eines Mediums, dem Scopoletin zugegeben wurde, mit neu hergestellten Standards von 50, 20, 10 und 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Scopoletin in 0,1% Ameisensäure in Wasser auf zwei Platten aufgetragen. Die Standards wurden jedes Mal auf die Positionen 1 bis 4 aufgetragen (Bande 1 bis 4). Auf Platte 1 wurde auf Position 5 das Medium, als Negativ-Kontrolle, sowie die Eluate 1 bis 4 auf die Positionen 6 bis 7 aufgetragen. Auf Platte 2 enthielt die Position 5 das Scopoletin versetzte Medium, Position 6 den Durchlauf und an Positionen 7 und 8 befanden sich die Waschfraktionen. Platte 1 lief 15 min. und Platte 2 10 min. mit einem Gemisch aus Ethylacetat und n-Heptan (6:4). Unter UV waren die Positionen 1 bis 4 und 7 der Platte 1 sichtbar, nach der Intensitätsauswertung, der aufgenommenen UV-Bilder, zeigte sich auch auf Position 5 der Platte 2 eine geringe Intensität (siehe Abb. 5 und 6). Aus diesen Messungen ergaben sich ein R_f -Wert von 0,34 (Platte 1 und 2) und eine Rückgewinnungsrate von 80%.

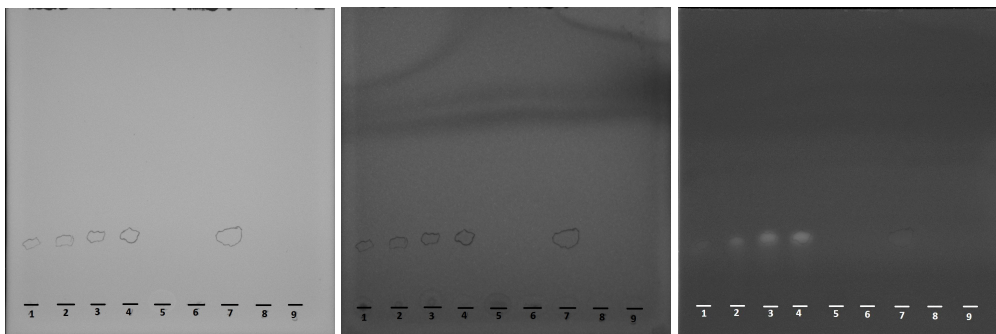


Abbildung 5: 10x 10 cm HPTLC Platte 1 mit 5, 10, 20 und 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ Scopoletin (Position 1 bis 4), Medium in Position 5, Eluate 1, 2, 3 und 4 in den Positionen 6 bis 9, betrachtet unter VIS (links), UV (mittig) und auf dem Transiluminator (rechts) nach einem 15 minütigem Lauf mit Ethylacetat und n-Heptan (6:4); Jede Bande enthielt 10 μl der jeweiligen Lösung.

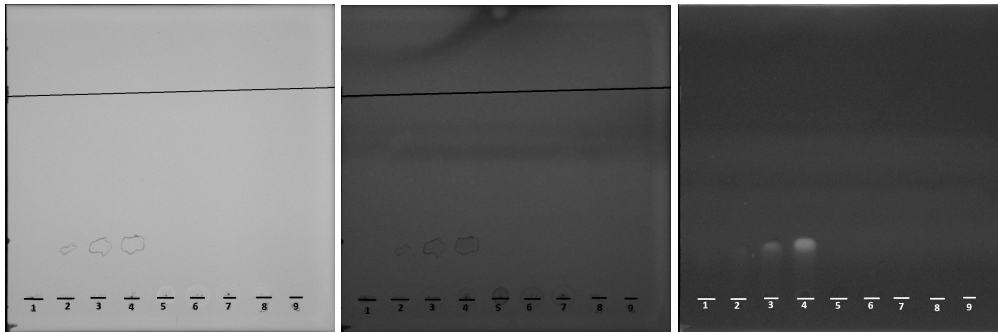


Abbildung 6: 10x 10 cm HPTLC Platte 2 mit 5, 10, 20 und 50 $ng/\mu l$ Scooletin (Position 1 bis 4), mit Scooletin enthaltendem Medium in Position 5, Durchlauf in den Positionen 6 und den Waschfraktionen in Positionen 7 und 8, betrachtet unter VIS (links), UV (mittig) und auf dem Transiluminator (rechts) nach einem 15 minütigem Lauf mit Ethylacetat und n-Heptan (6:4); Jede Bande enthielt 10 μl der jeweiligen Lösung.

Anschließend wurde der gleiche Versuch zwei weitere Male durchgeführt um statistisch genauer zu sein, doch konnte bei einem Versuch nur der Standard und die Eluat 2 Fraktion, nicht aber das Scooletin zugemischte Medium als Bande gesichtet werden. Beim Zweiten sowohl die Referenz als auch die Eluatfraktionen als Banden erkannt werden, aus diesem Experiment ergab sich eine Rückgewinnungsrate von 108,8%. Die R_f -Werte, wenn ermittelbar blieben mit 0,35 bis 0,32 fast unverändert.

Da sich die Standards der aufgetragenen Konzentrationen nicht linear verhielten wurden die weiteren Analysen mittel Plattenfotometer und HPLC durchgeführt.

Im Plattenfotometer wurden Scopoletin-haltige Lösungen, wie Standards oder Fraktionen aus Festphasenextraktionen auf ihr Verhalten unter Bestrahlung getestet. Als erstes wurde getestet, ob Scopoletin besser durch Messung der Absorption oder der Fluoreszenz detektierbar ist. Hierfür wurde ein Standard der Konzentrationen 1000, 200, 100, 50 und 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ in Methanol getestet. Die Messung der Absorption erfolgte bei 280 und 340 nm (Abb. 7), während die Fluoreszenz bei 336 nm angeregt wurde und bei 438 nm (Abb. 8) gemessen wurde.

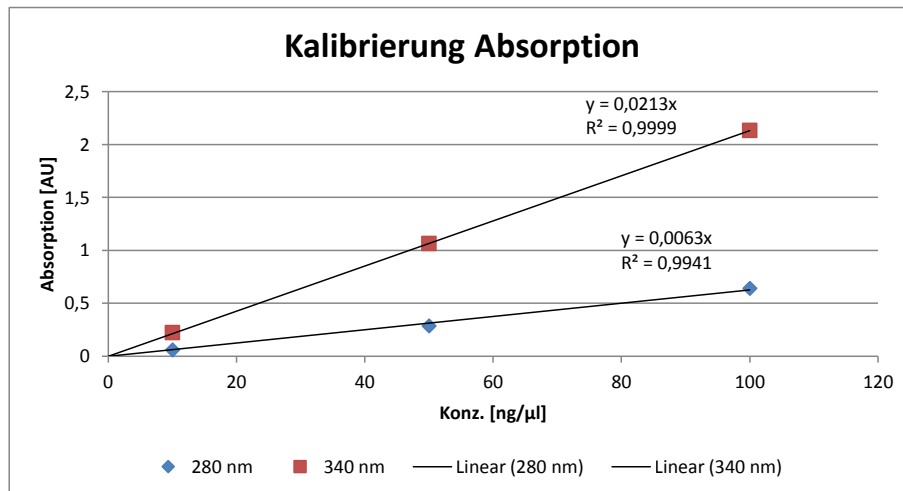


Abbildung 7: Linearer Bereich von Scopoletin unter Messung der Absorption im Plattenfotometer bei 280 und 320 nm.

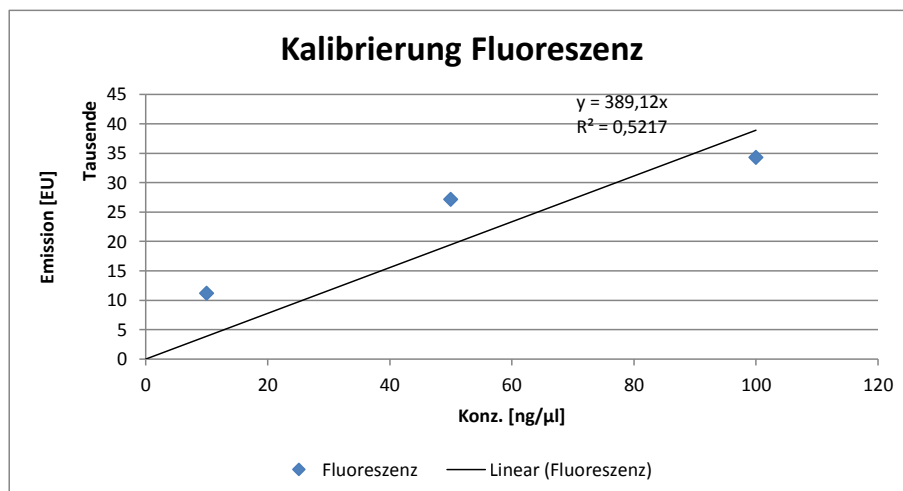


Abbildung 8: Linearer Bereich von Scopoletin unter Messung der Fluoreszenz im Plattenfotometer bei 336 nm Anregung und 438 nm Emission.

Es zeigte sich ein sehr lineares Verhalten bis 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ bei den Absorptionsmessungen von 280 und 340 nm, wohingegen die Messwerte der Fluoreszenz sich in diesem Bereich nicht sehr linear verhielten. Später stellte sich heraus, dass die Messwerte der Fluoreszenzmessung für Scopoletin sich nur bis 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ linear verhalten (Abb. 9). Aufgrund der höheren Messwerte und der dadurch einhergehenden höheren Sensitivität der Fluoreszenzmessung wurden fortan alle Bestimmungen des Scopoletingehaltes mittels Fluoreszenz gemessen.

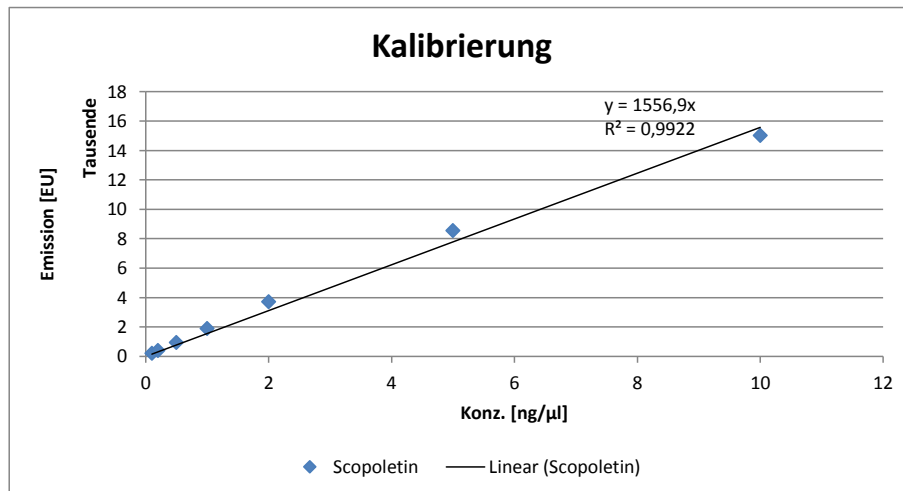


Abbildung 9: Linearer Bereich von Scopoletin unter Messung der Fluoreszenz im Plattenfotometer bei 336 nm Anregung und 438 nm Emission.

Die Nachweisgrenze, ab welcher sicher detektiert werden kann, wurde anhand der Kalibriergerade ermittelt. Die Berechnung der Nachweisgrenze wurde nach der Formel: $\frac{3x \text{ Messwert des Lösungsmittels}}{\text{Steigung der Kalibriergerade}}$ ermittelt und ergab eine Konzentration von 0,26 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (Abb. 10).

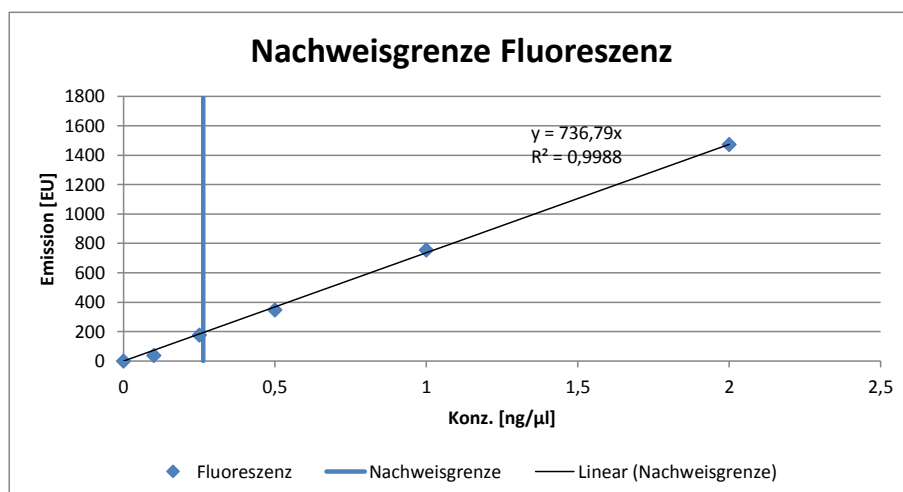


Abbildung 10: Linearer Bereich mit Nachweisgrenze von Scopoletin unter Messung der Fluoreszenz im Plattenfotometer bei 336 nm Anregung und 438 nm Emission.

Zur Analyse der Cumarine in den S2LS3-Zellen und deren Medien in der HPLC wurden die Peaks bei den Retentionszeiten 3,7 (Scopolin) und 5,0 (Scopoletin) untersucht (siehe Abb. 11).

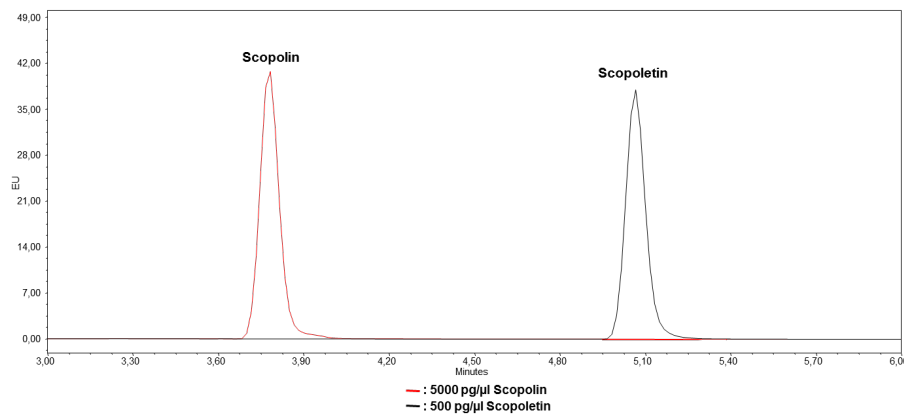


Abbildung 11: Chromatogrammausschnitt zwischen 3 und 6 Minuten von Scopolin- und Scopoletin Standards, gemessen wurde die Emission (EU) bei 438 nm nach der Anregung bei 336 nm.

Zum Isolieren und Konzentrieren der Cumarine aus den, nach Abtrennung der Zellen erhaltenen, Medien sollte eine Festphasenextraktion benutzt werden. Bei dieser Methode kann es vorkommen, dass ein Teil der Stoffe nicht richtig getrennt oder von der Kartusche gelöst wird, wodurch das Verhältnis zwischen Menge an zu isolierendem Stoff vor und nach der Festphasenextraktion von Nöten wird, als Rückgewinnungsrate bezeichnet. Die Rückgewinnungsrate wurde von einem Scopoletinstandard, mit Scopoletin zugemischtem Medium und Medium, aus der Abtrennung der Zellen, ermittelt. Zur Bestimmung der Rückgewinnungsrate vom Scopoletinstandard wurde die Kartusche mit 5 ml Methanol konditioniert, mit 10 ml einer Mischung aus 0,1% Ameisensäure in Wasser und Methanol (9:1) äquilibriert, mit 1 ml Standard der Konzentration von $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ beladen, gewaschen mit 10 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser und mit 5 ml Methanol in 10 Fraktionen eluiert. Aus den beiden Eluaten mit dem höchsten Scopoletingehalt ergab sich eine Rückgewinnungsrate von 85% (siehe Abb. 12).

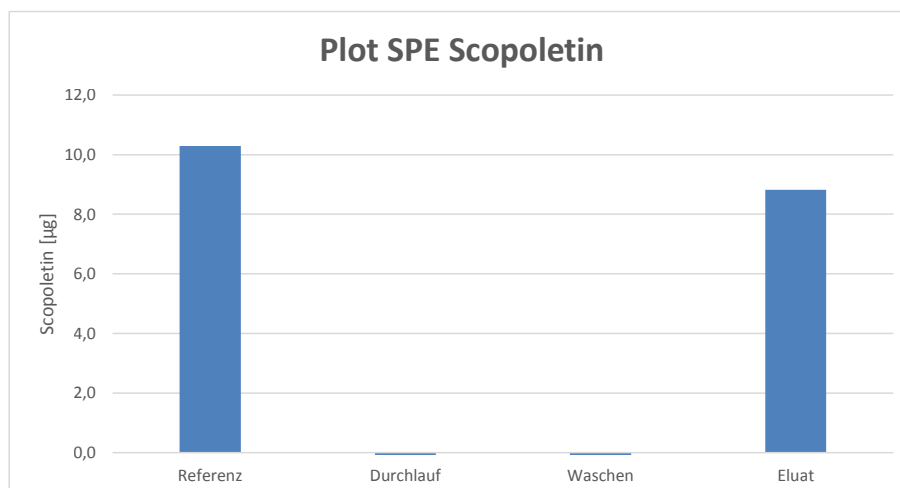


Abbildung 12: Inhalte der einzelnen Festphasenfraktionen in Scopoletin; Zum Beladen wurden $10 \mu\text{g}$ Scopoletinstandard benutzt, äquilibriert wurde mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und Methanol (9:1) und gewaschen mit 10 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser; Gemessen wurde die Fluoreszenz am Plattenfotometer bei 438 nm nach einer Anregung bei 336 nm; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

Im Anschluss an den Standard wurde die Rückgewinnungsrate von 10 ml Medium, dem 1 μg Scopoletin beigemischt wurde, bestimmt. Dieses Medium wurde auf die gleiche Weise wie der Standard behandelt, nur dieses Mal mit einer Eluatsfraktion von 1 ml. Zu sehen war deutlich, dass die Referenzprobe keine 1 μg enthielt und der Durchlauf sehr viel Scopoletin (72 ng) aufwies (Abb. 13). Es wurde eine Rückgewinnungsrate von 11% erreicht.

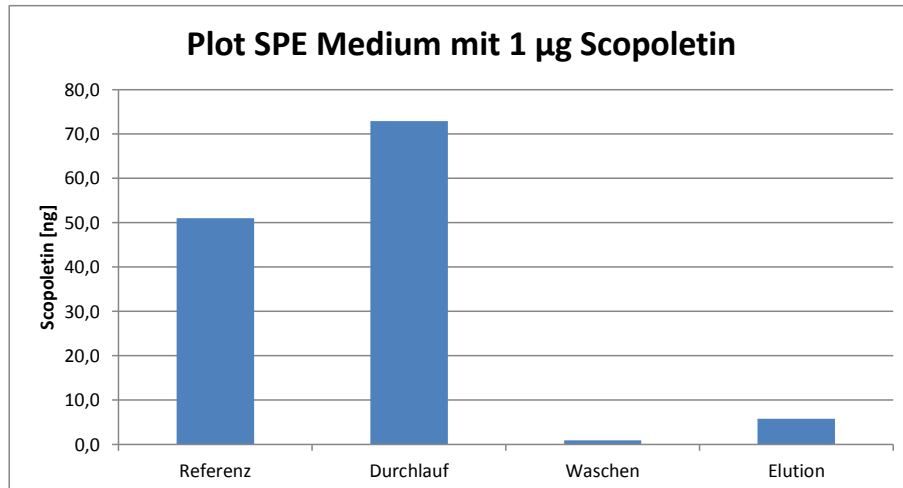


Abbildung 13: Übersicht Scopoletiningehalt des Mediums, mit 1 μg Scopoletin, nach der Festphasenextraktion, gemessen im Plattenfotometer bei einer Anregung von 336 nm und einer Emission bei 438 nm; Zum Beladen wurden 10 μg Scopoletinstandard benutzt, äquilibriert wurde mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und Methanol (9:1) und gewaschen mit 10 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

Da das meiste Scopoletin im Durchlauf gefunden wurde, war anzunehmen, dass die Bindung an die stationäre Phase der Kartusche nicht vollständig erfolgte. Um die Bindung an die stationäre Phase der Kartusche zu verbessern wurde der Methanolanteil in der Äquibrierlösung auf 2% reduziert, zwei Mal mit 0,1% Ameisensäure in Wasser gewaschen und in vier Fraktionen zu je 1 ml eluiert. Die Rückgewinnungsrate betrug $34\% \pm 9\%$. Auch in diesen Messungen ergaben sich für die Referenz keine $1 \mu\text{g}$ (Abb. 14). Daraufhin wurde der Standard, der zur Zugabe des Scopoletins ins Medium genutzt wurde, in der HPLC untersucht. Dabei zeigte sich in allen Verdünnungsstufen, dass kaum Scopoletin enthalten war. Erkennbar war auch, dass der Scopoletingehalt der einzelnen Verdünnungsstufen sich kaum unterschied. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde zum weiteren Zumischen von Scopoletin ins Medium ein neu angesetzter Standard benutzt.

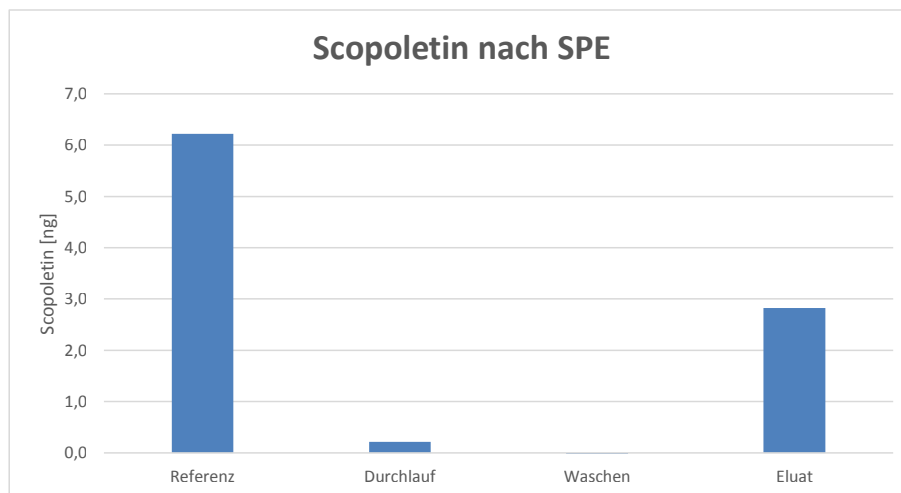


Abbildung 14: Übersicht Scopoletingehalt des Mediums, mit $1 \mu\text{g}$ Scopoletin, nach der Festphasenextraktion, gemessen im Plattenfotometer bei einer Anregung von 336 nm und einer Emission bei 438 nm; Zum Beladen wurden $10 \mu\text{g}$ Scopoletinstandard benutzt, äquilibriert wurde mit 0,1% Ameisensäure in Wasser und 2% Methanol und gewaschen mit 10 ml 0,1% Ameisensäure in Wasser; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

Anschließend wurde untersucht, ob die Fluoreszenz in Methanol und in 0,1% Ameisensäure in Wasser, nach Abzug des Lösungsmittelwertes, gleich groß ist. Hierfür wurden zwei neue Standards hergestellt, einer in Methanol und in 0,1% Ameisensäure in Wasser. Diese Standards wurden zusammen mit ihren Lösungsmitteln im Plattenfotometer bei 336 nm Anregung und 438 nm Emission gemessen.

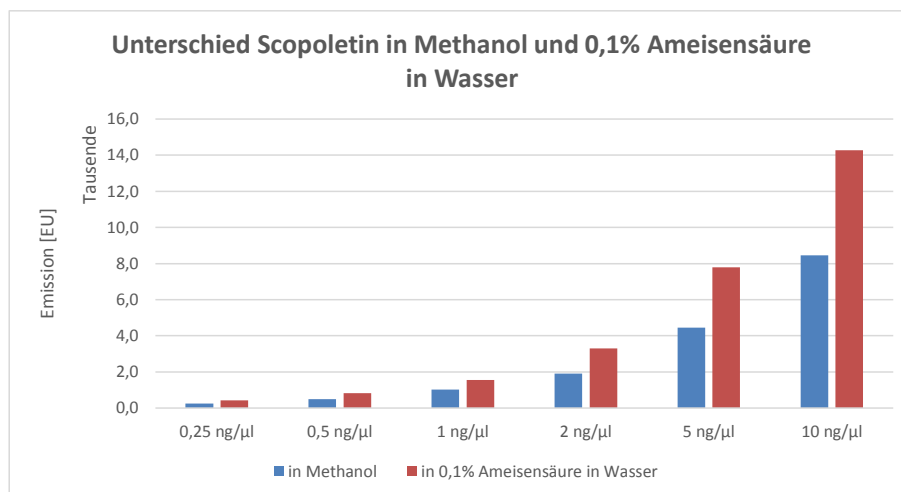


Abbildung 15: Unterschied zwischen Scopoletinstandards in Methanol und 0,1% Ameisensäure in Wasser, gemessen bei einer Emission von 438 nm nach der Anregung bei 336 nm.

Um ausschließen zu können, dass die hinzugegebene Menge Scopoletin, aufgrund eines Pipettierfehlers bei der Herstellung des Standards, stark von der theoretischen Konzentration abweicht wurde ein neuer Standard hergestellt und 10 μg zum Medium gemischt. Die Festphasenextraktion erfolgte nach den optimierten Protokoll (Äquibrierlösung 2% Methanol, zwei Mal waschen und vier Eluate zu je 1 ml). Die Messungen der Referenz erreichten einen ungefähren Wert von 10 μg . Die Durchlauf- und Waschfraktionen wiesen kaum bis kein Scopoletin auf (Abb. 16). Aus den Eluaten 1 und 2 wurde eine Rückgewinnungsrate von $60\% \pm 3\%$ ermittelt. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionen von Scopoletin in Methanol und 0,1% Ameisensäure in Wasser wurden die Eluate, vor injizieren in die HPLC, 1:10 in 0,1% Ameisensäure in Wasser verdünnt. In den Referenzen und den Eluaten wurden etwa 10 μg Scopoletin gemessen, dies zeigte sich auch in den Rückgewinnungsraten von $95\% \pm 5\%$ (Abb. 17).

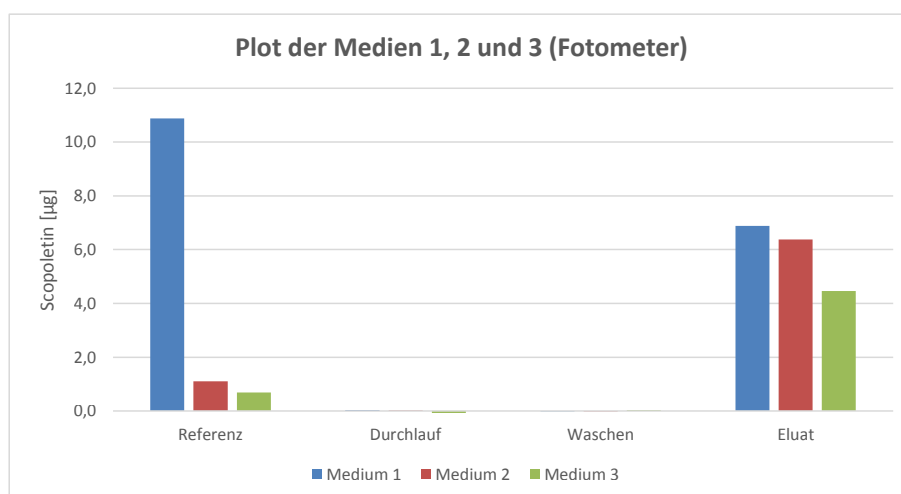


Abbildung 16: Scopoletingehalt der einzelnen Fraktionen der Festphase, durchgeführt nach dem optimierten Protokoll, bei einer Anregung von 336 nm und Emission bei 438 nm im Fotometer; Es wurden 10 μg Scopoletin dem Medium zugegeben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

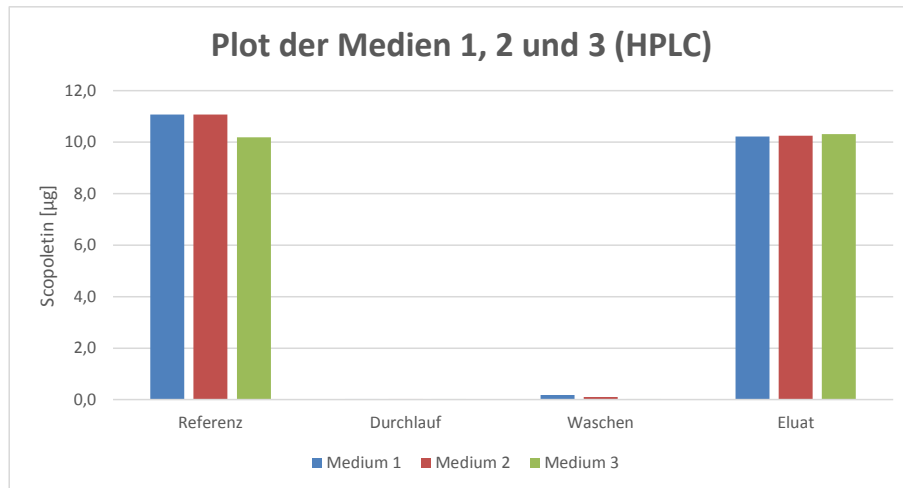


Abbildung 17: Darstellung des Scopoletingehaltes in den einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion der 1:10 verdünnten Medien, mit 10 µg Scopoletin enthaltenden Medien, welche sich durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ergaben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

Im, durch Zellabtrennung gewonnenes, Medium liegt Scopoletin nicht als einziger sekundärer Metabolit vor, weshalb es notwendig war zu überprüfen, ob Scopoletin in einem Gemisch zu detektieren ist. Dieses Gemisch wurde aus 1 µg Scopoletin, Chlorogensäure und Rutin x 3H₂O hergestellt und eine Festphasenextraktion nach dem optimierten Protokoll durchgeführt (Alle Eluate wurden in einer Fraktion aufgefangen). Rutin und Chlorogensäure wurden aufgrund ihrer fehlenden Fluoreszenz bei 336 nm Anregung und Emission bei 438 nm gewählt. Die Eluate wurden 1:10 in 0,1% Ameisensäure in Wasser verdünnt und anschließend am Plattenfotometer gemessen. Es konnte etwa 1 µg Scopoletin in der Referenz nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde kein Scopoletin in Wasch- oder Durchlauf fraktionen gefunden, wohingegen das Eluat etwa 1 µg aufwies (Abb. 18). Es ergab sich eine Rückgewinnungsrate von 97%. Als Vergleich wurden die Fraktionen zusätzlich in der HPLC analysiert. Diese zeigte ähnliche Ergebnisse mit dem Unterschied, dass die Rückgewinnungsrate 111% betrug (Abb. 19).

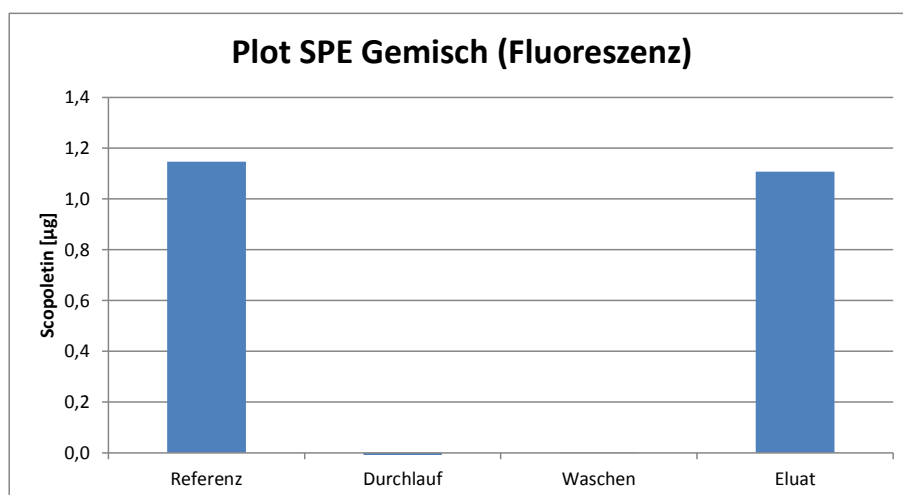


Abbildung 18: Scopoletingehalt in µg jeder Lösung der Festphasenextraktion, eines Scopoletin-Rutin-Chlorogensäure Gemischs, bei der Messung der Fluoreszenz (Anregung: 336 nm und Emission: 438 nm); Alle vier ml wurden in eine Fraktion aufgefangen und vor der Messung 1:10 verdünnt.

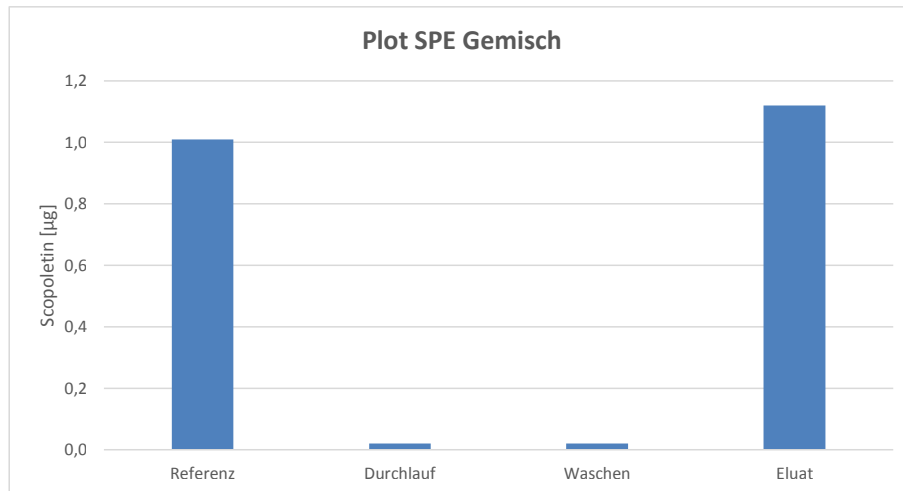


Abbildung 19: Scopoletingehalt der Fraktionen der Festphasenextraktion des Gemischs aus Scopoletin, Chlorogensäure und Rutin, detektiert durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).

Es wurde versucht die Rückgewinnungsrate der Medien, nach der Zellabtrennung, zu bestimmen. Doch ließ sich in Vorexperimenten feststellen, dass die Fließgeschwindigkeit beim Beladen der Kartusche rapide abnahm. Aus diesem Grund wurden diese Medien 1:10 in 0,1% Ameisensäure verdünnt bevor sie zum Beladen der Kartusche benutzt wurden. Die Vorbereitung der Kartusche erfolgte nach dem optimierteren Protokoll. Messungen mit dem Plattenfotometer ergaben zwischen 0,2 und 1 μg Scopoletin in den Medien (Abb. 20). Weiterhin wurde eine Rückgewinnungsrate von $69\% \pm 37\%$ festgestellt. Als Vergleich zur Messung im Fotometer wurden die gleichen Fraktionen auch in der HPLC untersucht. In dieser Messung wurden von 0,3 bis 0,8 μg Scopoletin in den Referenzen detektiert (Abb. 21). Bei dieser Messung betrug die Rückgewinnungsrate $84\% \pm 5\%$. Zusätzlich zum Scopoletingehalt wurde der Scopolingehalt dieser Medien über die HPLC bestimmt (siehe Abb. 21). Es wurden deutlich höhere Mengen Scopolin in den Fraktionen als Scopoletin gefunden. In den Referenzen wurden zwischen 1 und 1,6 μg Scopolin detektiert. Viel Scopolin wurde auch in den Wasch- und Durchlaufsfractionen gefunden (Abb. 22). Die Rückgewinnungsrate von Scopoletin betrug $56\% \pm 27\%$.

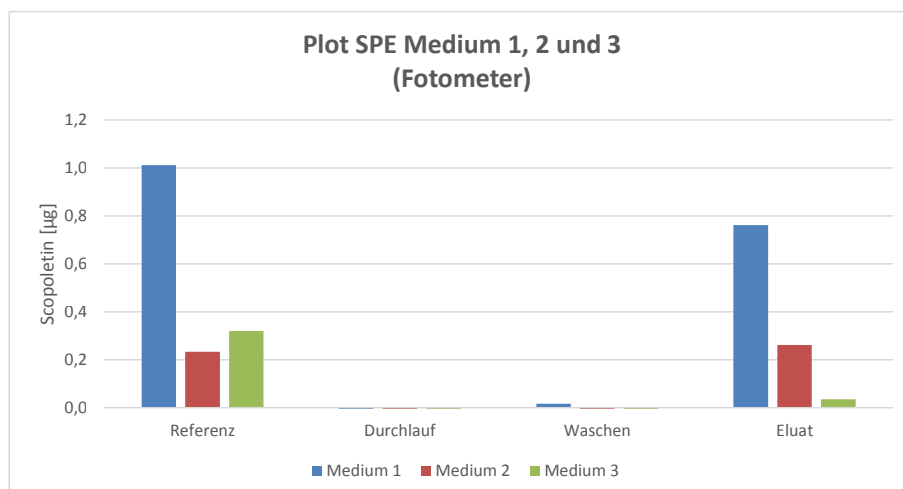


Abbildung 20: Fraktionen nach der Festphasenextraktion, der Medien nach Zellabtrennung, nach dem optimierteren Protokoll, gemessen bei Ex: 336 nm und Em: 438 nm; Die Medien wurden vor und die Eluate nach der Festphasenextraktion 1:10 verdünnt; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst; Die Messung erfolgte über das Plattenfotometer.

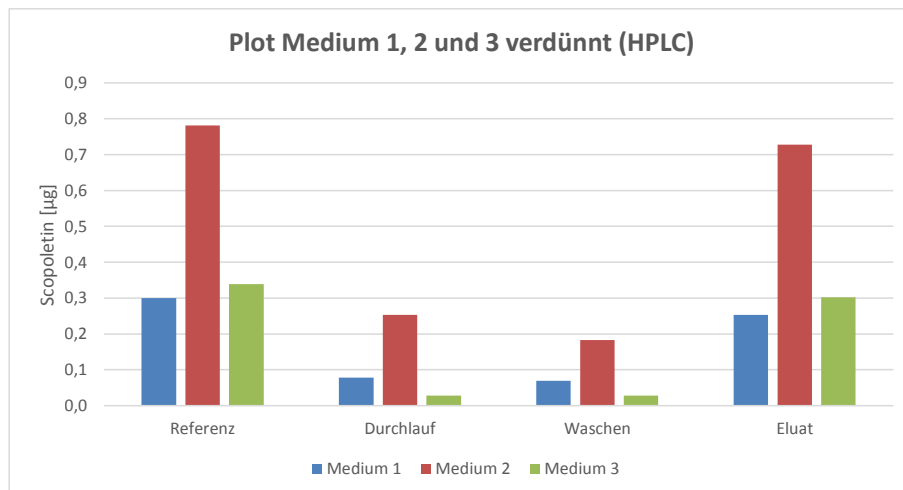


Abbildung 21: Darstellung des Scopoletingehaltes in den einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion der 1:10 verdünnten Medien, welche sich durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ergaben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

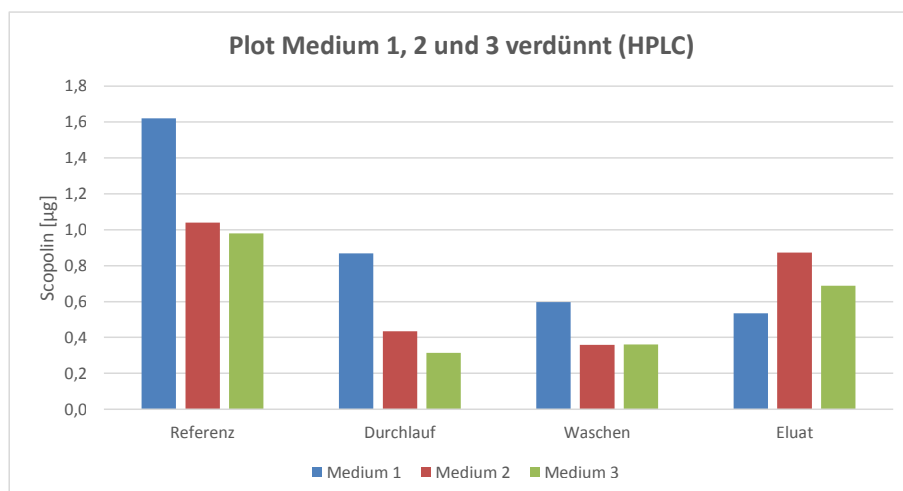


Abbildung 22: Darstellung des Scopolingehaltes in den einzelnen Fraktionen der Festphasenextraktion der 1:10 verdünnten Medien, welche sich durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ergaben; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

Aufgrund der hohen Scopolin- und Scopoletinwerte in den Durchläufen und Waschfraktionen der Festphasenextraktionen der 1:10 verdünnten Medien wurde versucht eventuell im Medium verbliebene Zellen durch Filtration abzutrennen. Hierfür wurden das Medium, mit den eventuell darin enthaltenen Zellen, durch einen Nylon Filter mit einer Porengröße von 20 μm gezogen. Es folgten zwei weitere Filtrationen, die Erste mit einem 20 μm Nylon Filter und die Zweite durch ein 0,45 μm PET Filter (siehe Abb. 23 und 24). Die Filtration erhöhte die Rückgewinnungsrate von Scopolin auf 95% und von Scopoletin auf 93%. Doch durch die Filtration verblieben ca. 77% des Scopoletins auf den Filtern, während der Scopolingehalt auf ca. 13% sank.

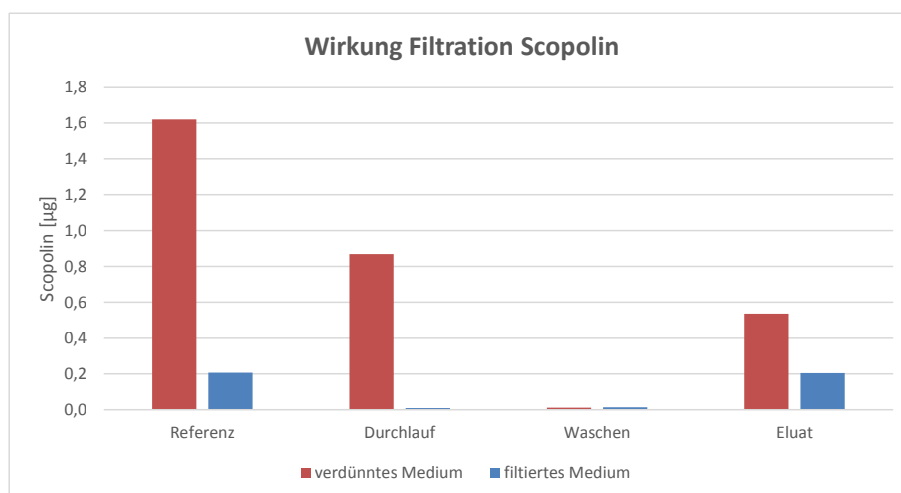


Abbildung 23: Verlust an Scopolin durch Filtration der Fraktionen der Festphasenextraktionen, durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ermittelt; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

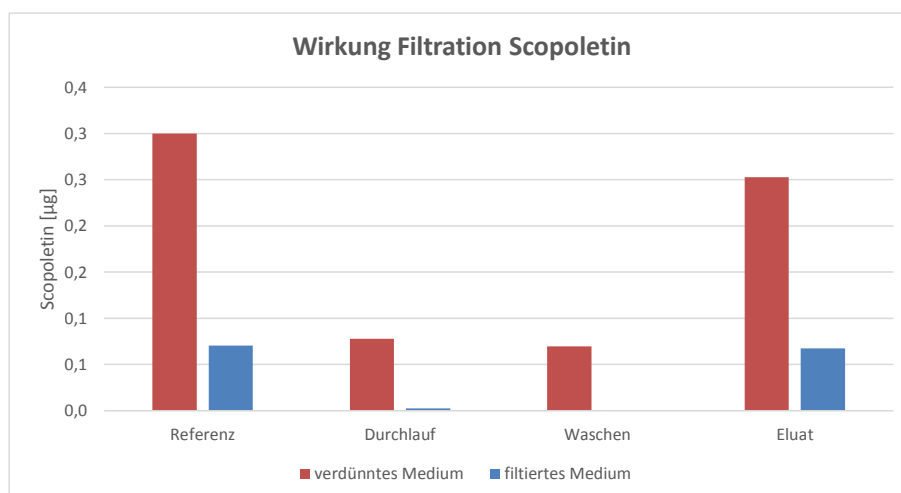


Abbildung 24: Verlust an Scopoletin durch Filtration der Fraktionen der Festphasenextraktionen, durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm) ermittelt; Alle Wasch- und Eluatfraktionen wurden zu einer zusammengefasst.

Es wurde danach überprüft, ob der Verlust durch das Filtermaterial verursacht wurde und verwendete deshalb für den letzten Filtrationsschritt einen $0,45\ \mu\text{m}$ Nylon Filter. Es wurde ein Medium, erhalten durch Abtrennen der Zellen, filtriert und Aliquots vor und nach jeder Filtration entnommen, um bestimmen zu können bei welcher Porengröße der Verlust am größten war. Es stellte sich heraus, dass die Menge an Scopolin mit insgesamt 30% Verlust weniger abnahm als Scopoletin mit ca. 95% (Abb. 25). Der größte Verlust an Scopolin wurde bei einer Porengröße von $20\ \mu\text{m}$ verzeichnet, während sehr viel Scopoletin auf dem zweiten Filter, der Größe $1,2\ \mu\text{m}$, verblieb.

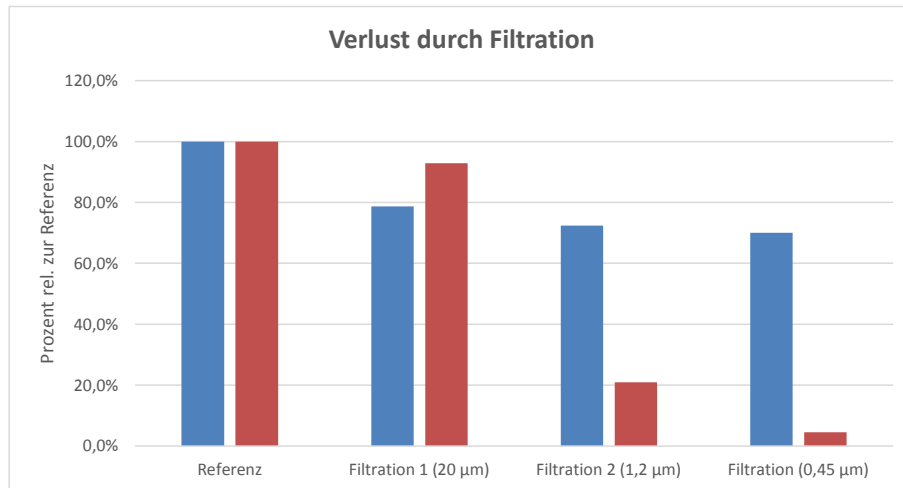


Abbildung 25: Filtration eines durch Zellabtrennung erhaltenen Mediums durch Nylonfilter der Porengröße 20 , $1,2$ und $0,45\ \mu\text{m}$ nach jedem Filtrationsschritt, Scopolin und Scopoletin durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: $336\ \text{nm}$ und Em: $438\ \text{nm}$) gemessen.

Aufgrund der sehr kleinen Messwerte der Medien in den Vorversuchen wurde ein Standard von 5 bis $1000\ \text{pg}/\mu\text{l}$ Scopoletin und 5 bis $5000\ \text{pg}/\mu\text{l}$ Scopolin benutzt. Die Proben der Zellen wurden daher 1:5 verdünnt.

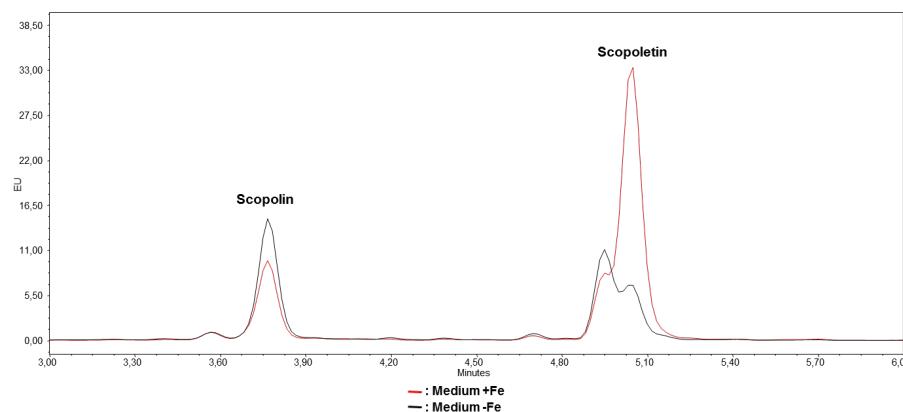


Abbildung 26: Ausschnitt von 3 bis 6 Minuten des Chromatogramms der +Fe und -Fe Medien nach Zentrifugation, ermittelt durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: $336\ \text{nm}$ und Em: $438\ \text{nm}$).

Um den Cumaringehalt der Zellen mit dem Gehalt des Mediums vergleichen zu können wurden der Scopolin- und Scopoletingehalt pro ml Medium berechnet (Abb. 27). Zusätzlich wurde, als Maß der Syntheseänderung durch eisenarmes Medium der Scopolin- und Scopoletingehalt relativ zur Zellmasse ermittelt (Abb. 28). Auch im eisenarmen Medium wurden höhere Mengen Cumarine gefunden, als im eisenhaltigem Medium. Und genau, wie in den Zellen, wurde in allen Medien mehr Scopolin als Scopoletin detektiert. Relativ zum Volumen des Mediums erhöhte sich der Scopolingehalt auf etwa das Doppelte und Scopoletin auf etwa das Achtfache der Menge im

eisenhaltigen Medium (Abb. 27). Als statistisch signifikant zeigte sich, durch einen *t*-Test, allerdings nur die Änderung des Scopolins.

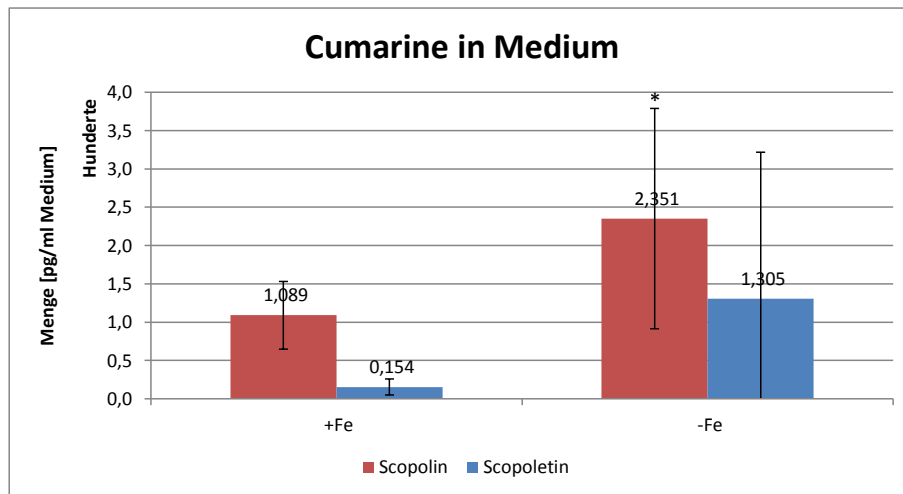


Abbildung 27: Mittelwerte mit Standardabweichung in *pg/ml* Medium an Scopolin und Scopoletin der Medien, gemessen über die Fluoreszenz in der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).

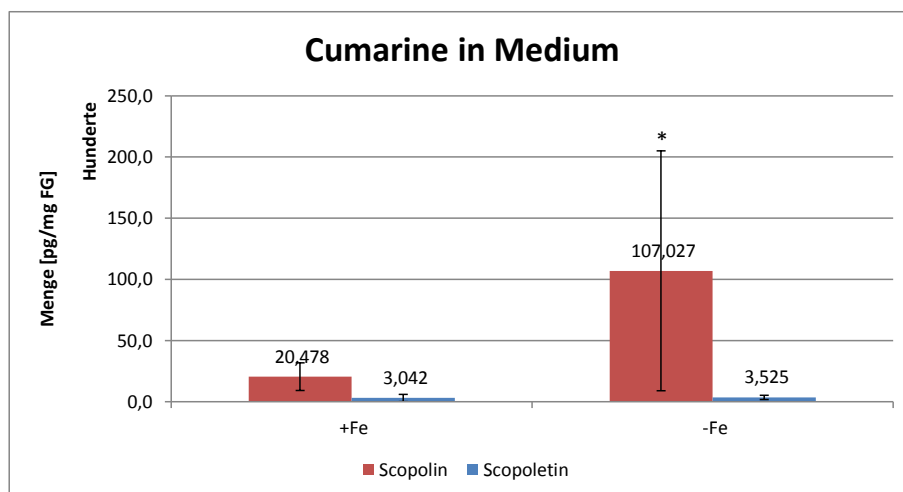


Abbildung 28: Mittelwerte mit Standardabweichung in *pg/ml* Medium an Scopolin und Scopoletin der Medien, gemessen über die Fluoreszenz in der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).

5.2 Analyse des Cumaringehalt der S2LS3-Zellen

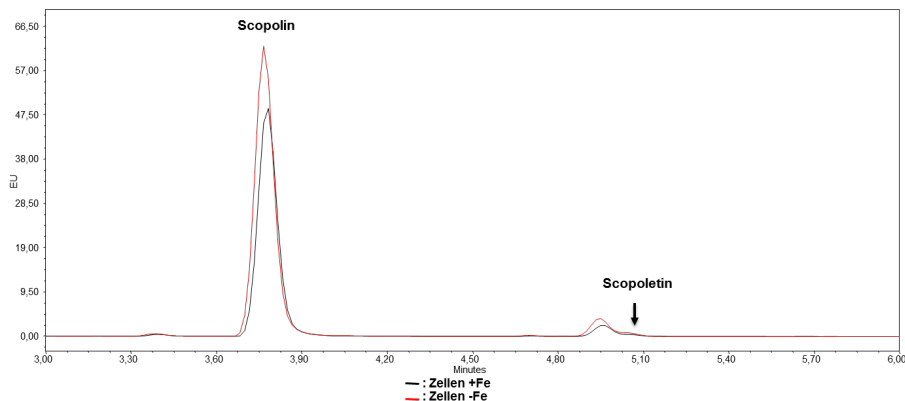


Abbildung 29: Ausschnitt von 3 bis 6 Minuten des Chromatogramms der S2LS3-Zellen auf +Fe und -Fe Medien erhalten durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).

Um festzustellen wie hoch der Scopolin- und Scopoletingehalt der Zellen ist und gegebenenfalls die Standards daran anzupassen wurden phenolische Extrakte in der HPLC untersucht. Neben den Peaks der Retentionszeiten 3,7 (Scopolin) und 5,0 (Scopoletin) wurde ein Peak bei 4,95 Minuten in allen Zellproben gefunden. Es erfolgte keine quantitative Auswertung dieses Peaks, da dessen Zusammensetzung unbekannt war.

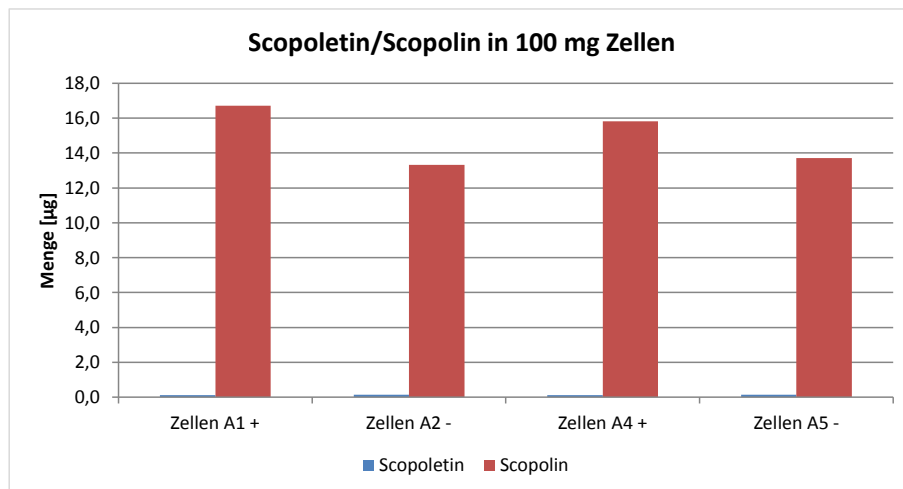


Abbildung 30: Anteil Scopolin und Scopoletin in 100 mg S2LS3 Zellen (Frischgewicht), erhalten durch die Fluoreszenzmessung der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).

In Zellen, die auf eisenarmen Medien wuchsen konnte mehr Scopolin und Scopoletin als in Zellen auf eisenhaltigen Medien gefunden werden, wobei der Scopolingehalt wesentlich größer war als der Scopoletingehalt. Der Unterschied zwischen eisenhaltigem und eisenarmen Medium war für Scopoletin deutlich zu sehen, während der Gehalt an Scopolin fast unverändert blieb (siehe Abb. 31).

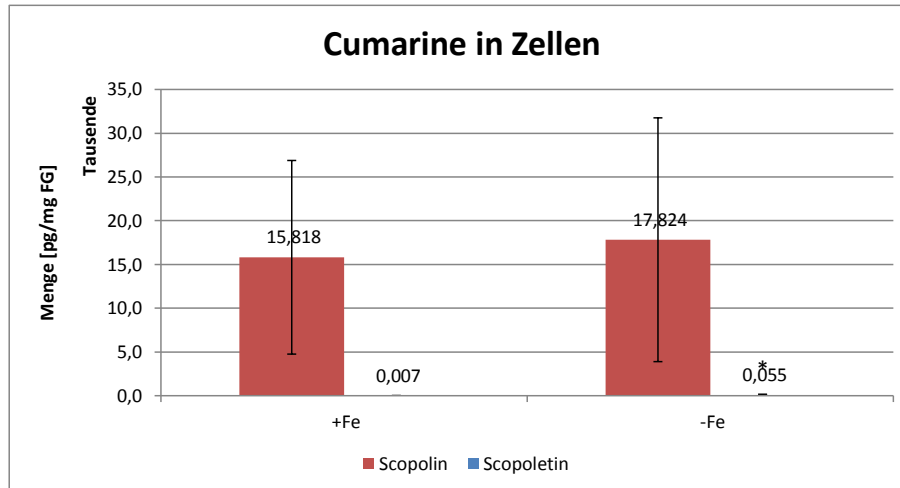


Abbildung 31: Mittelwerte mit Standardabweichung in *pg/mg* Frischgewisch an Scopolin und Scopoletin in S2LS3-Zellen, die auf eisenhaltigem und eisenarmen Medium wuchsen, gemessen über die Fluoreszenz in der HPLC (Ex: 336 nm und Em: 438 nm).

5.3 Mikroskopie

Es wurden zwei biologische Replikate gefärbt, das Erste ohne und das Zweite mit Vorselektion nach Eisenmangelsymptomen, dies zeigte sich auch in den teilweise sehr hohen Standardabweichungen. Es wurden bis zu zehn Pflanzen jedes Mediums mikroskopiert des ersten Replikates, dies dauerte mitunter länger als zwei Stunden. Je länger die gefärbten Pflanzen standen, desto höher wurde die Wahrscheinlichkeit, dass das Fluorol-Yellow in das Xylem diffundiert. Beim mikroskopieren wurden zuerst die Wurzeln auf eisenhaltigem Medium, dann die Wurzeln mit geringem Eisenmangel und zuletzt die Wurzeln mit hohem Eisenmangel mikroskopiert. In jeder Gruppe wurden jeweils zuerst die Mutanten, dann der Wildtyp mikroskopiert. Bei allen Messwerten des ersten Replikates sanken oder stiegen die Werte von eisenhaltig (+Fe) zu schwacher Eisenmangel (-Fe 60), wohingegen die Messwerte der starker Eisenmangel (-Fe 90) etwa den Werten der +Fe Wurzeln entsprachen oder den durch -Fe 60 gesetzten Trend umkehrten. Mit ein paar Ausnahmen traf diese Regel auf alle Messwerte dieses Replikates zu. Alle Änderungen sind relativ zum jeweiligen Genotyp auf +Fe betrachtet worden, dies gilt für beide Replikate. Beide Genotypen wiesen im ersten Replikat nur sehr geringe Änderungen zueinander auf. Im Wildtyp ließ sich, durch die Intensitätsmessung, ein Anstieg von ca. 14% des teil suberinisierten Bereiches auf +Fe Medium gegenüber -Fe 60 feststellen, während der voll suberinisierte Bereich um etwa den gleichen Betrag sank und der nicht suberinisierte Teil annähernd gleich blieb (Abb. 32). Die Suberinverteilung in der Mutante und dem Wildtyp waren etwa gleich. Auch die Reaktion auf -Fe 60 fiel ähnlich der des Wildtyps aus, nur etwas schwächer.

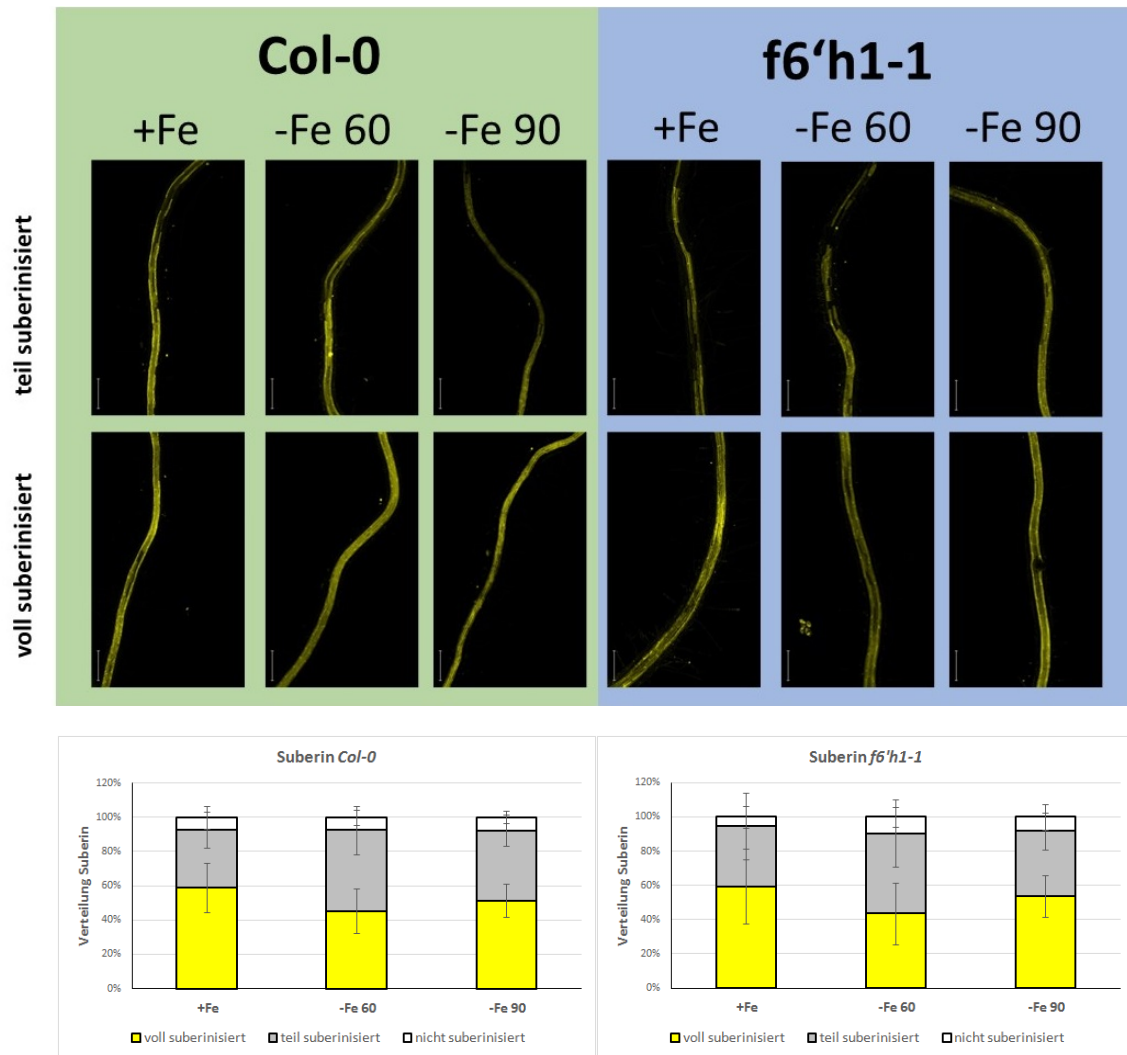


Abbildung 32: Verteilung des Suberins im *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des ersten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien als Mikroskopaufnahmen (oben) und als Diagramme (unten); Eisenmangel wurde durch 60 μ l (-Fe 60) bzw. 90 μ l (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für die abgebildeten Wurzeln erfolgte keine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Mikroskopaufnahmen wurden mit Zeiss LSM 780 zwischen 493 und 578 nm gemessen; Maßstabsbalken entspricht 200 μ m; Messwerte wurden über die mittlere Intensität bestimmt.

Anders als in der Intensitätsmessung zeigte die Flächenberechnung des ersten Replikates im Wildtyp eine Steigung des voll suberinisierten Bereich und ein Absinken des nicht suberinisierten Bereiches von +Fe zu -Fe 60, der teil suberinisierte Bereich blieb etwa gleich (Abb. 33). Im Kontrast dazu blieb der nicht suberinisierte Bereich der Mutante gleich, der teilsubinisierte Bereich stieg im gleichen Maß, wie der voll suberinisierte Bereich fiel.

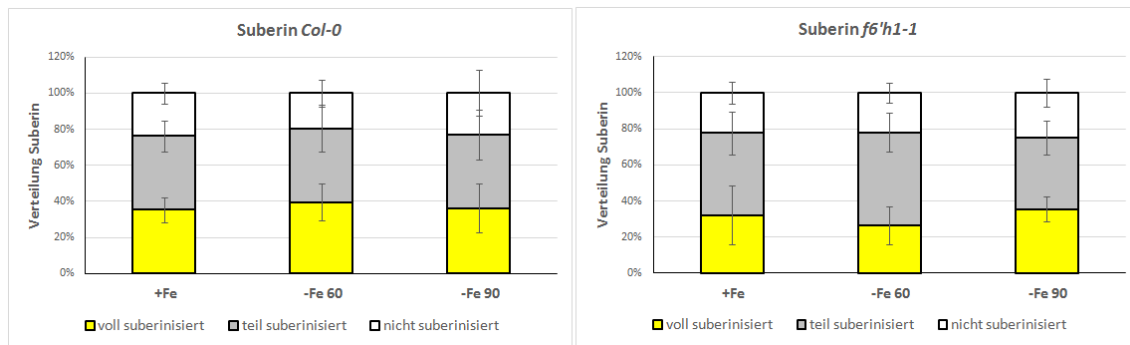


Abbildung 33: Verteilung des Suberins im *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des ersten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μ l (-Fe 60) bzw. 90 μ l (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte keine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die berechnete Fläche ermittelt.

Die Messwerte nach den Zellzahlen zeigten ein ähnliches Verhalten, wie die Messwerte der Fläche. Der nicht suberinisierte Bereich sank und der voll suberinisierte Bereich des Wildtypes stieg im gleichen Maße an (Abb. 34). Die Mutante verhielt sich gegensätzlich, hier stiegen nicht- und teil suberinisierter Bereich an und der voll suberinisierte Bereich schrumpfte.

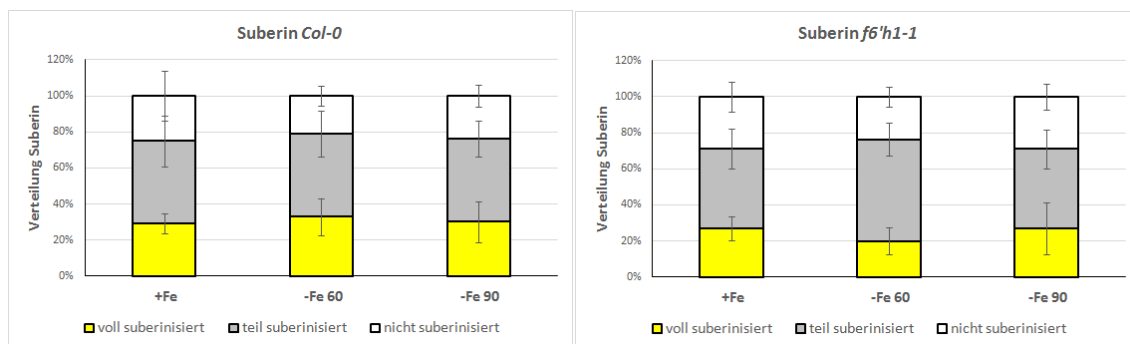


Abbildung 34: Verteilung des Suberins im *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des ersten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μ l (-Fe 60) bzw. 90 μ l (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte keine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die Zellzahl ermittelt.

Beide Genotypen, aller Messungen des zweiten Replikates, unterschieden sich auch auf +Fe stärker, als die +Fe Wurzeln des ersten Replikates. Das zweite Replikate enthielt je 5 bzw. 4 Wurzeln, die auf +Fe und -Fe 90 gewachsen sind. Das Mikroskopieren dieses Replikates dauerte keine zwei Stunden, da in diesem Replikate insgesamt nur etwa ein Drittel der Wurzeln des ersten Replikates angefärbt wurden. Trotz der kleineren Anzahl an Wurzeln waren die Standardabweichungen im Mittel etwas geringer als die des ersten Replikates und die Unterschiede zwischen den Medien deutlicher sichtbar. Für den Wildtyp konnte durch die Intensitätsmessung eine Zunahme des nicht suberinisierten Bereiches und eine Abnahme des voll suberinisierten Bereiches beobachtet werden (Abb. 35). Die Mutante wies eine Zunahme im voll suberinisierten Bereich und eine Abnahme des teil suberinisierten Bereiches auf.

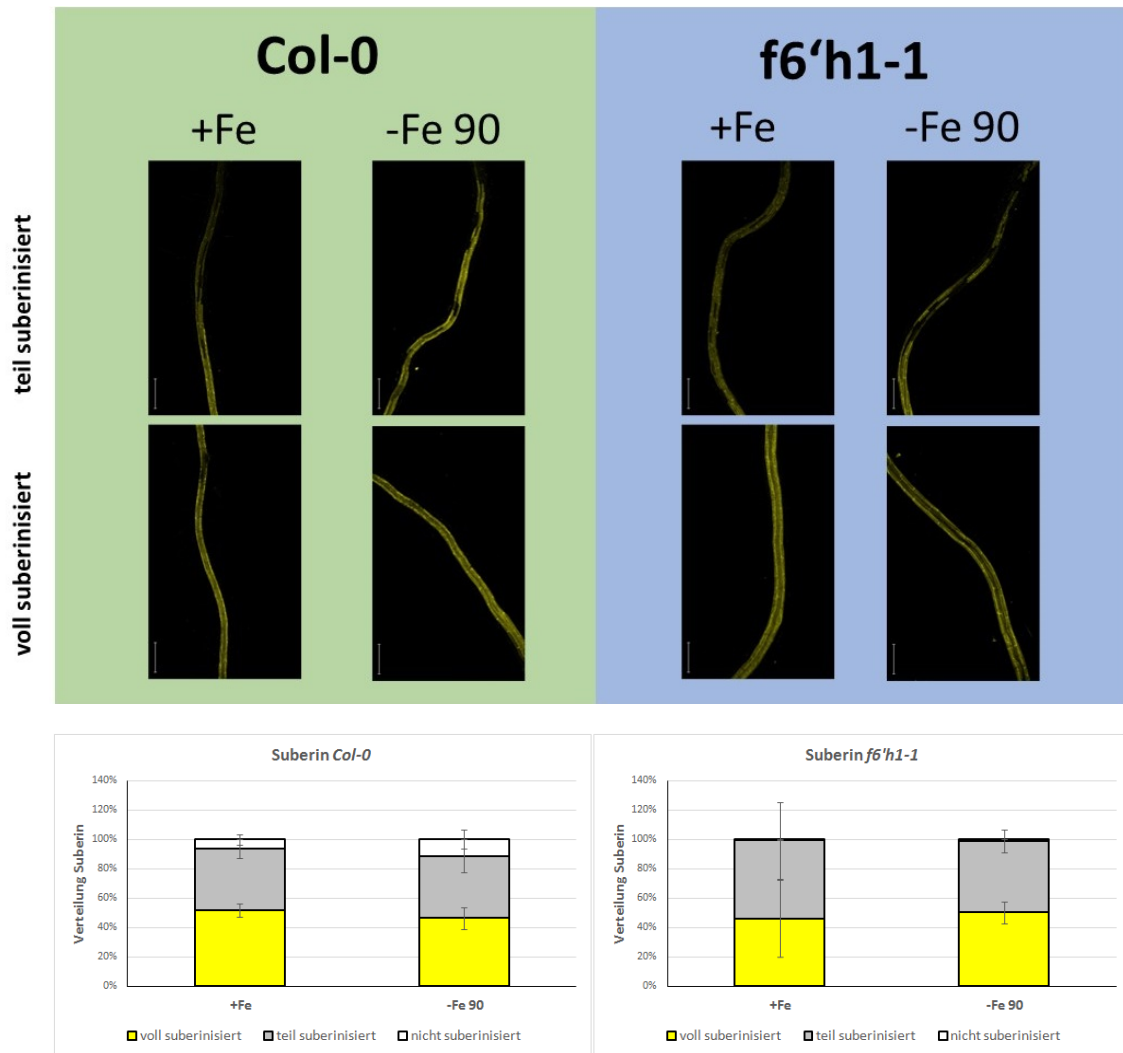


Abbildung 35: Verteilung des Suberins im *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des zweiten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien als Mikroskopaufnahmen (oben) und als Diagramme (unten); Eisenmangel wurde durch 90 μ l (-Fe 90) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für die abgebildeten Wurzeln erfolgte eine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Mikroskopaufnahmen wurden mit Zeiss LSM 780 zwischen 493 und 578 nm gemessen; Maßstabsbalken entspricht 200 μ m; Messwerte wurden über die mittlere Intensität bestimmt.

Ähnlich der Intensitätsmessung des ersten Replikates sank der voll suberinisierte Bereich des Wildtyps und der Mutante des zweiten Replikates, in der Flächenmessung (Abb. 36). Auch wurde bei beiden Genotypen eine Zunahme im nicht- und teil suberinisierten Bereich verzeichnet. Alle Änderungen der Mutante waren stärker im Vergleich zum Wildtyp.

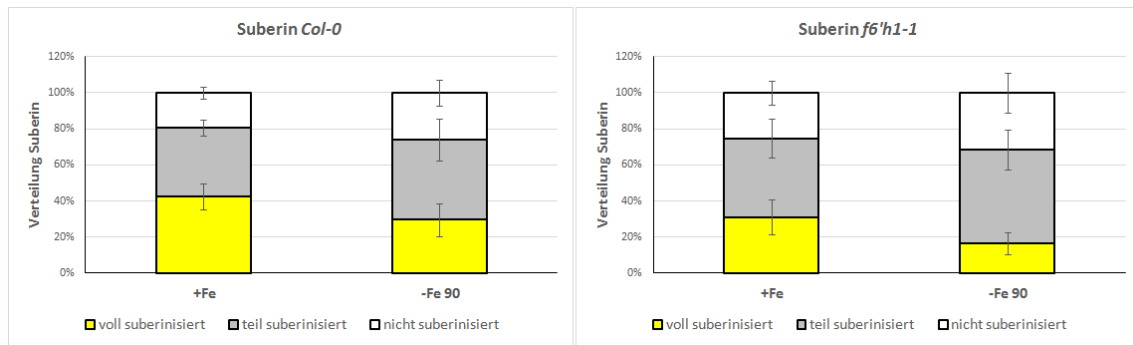


Abbildung 36: Verteilung des Suberins im *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des zweiten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μl (-Fe 60) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte eine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die berechnete Fläche ermittelt.

Das gleiche Verhalten, beschrieben durch die Messwerte der Fläche, zeigte sich auch in den Messwerten, die durch die Zellzahl bestimmt wurden (Abb. 37). Die nicht- und teil suberinisierten Bereiche wurden größer und der voll suberinisierte Bereich sank, nur mit dem Unterschied, dass die Unterschiede dieses Mal im Wildtyp größer waren als in der Mutante.

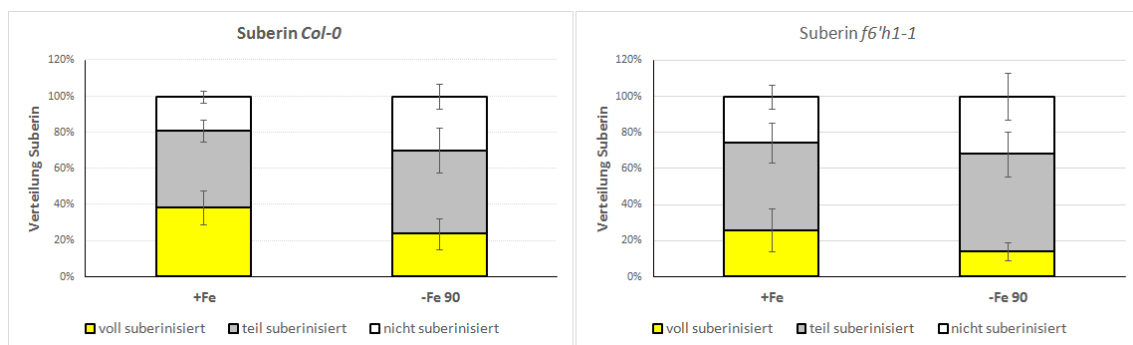


Abbildung 37: Verteilung des Suberins im *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (links) und Mutante (rechts) des zweiten Replikates auf eisenhaltigen und eisenmangel Medien; Eisenmangel wurde durch 60 μl (-Fe 60) Ferrozin pro 50 ml Medium induziert; Für diese Wurzeln erfolgte eine Vorselektion nach Symptomen für Eisenmangel; Messwerte wurden über die Zellzahl ermittelt.

6 Diskussion

6.1 Mehr Cumarine durch Eisenmangel

Wie durch Schmid et al. (2014) in *Arabidopsis thaliana* beschrieben ließen sich unter eisenarmen Bedingungen mehr Scopolin und Scopoletin in *S2LS3*-Zellen und deren Medien finden. Hieraus lässt sich schließen, dass sich *S2LS3*-Zellkulturen auch als Versuchsorganismus zur Analyse der Cumarinsynthese eignen. Weiter konnte beobachtet werden, dass der Scopolingehalt, sowohl in den Zellen als auch im Medium den Scopoletingehalt immer übersteigt. Die Untersuchungen anderer Pflanzenarten, wie Süßkartoffeln und *Manihot esculenta* wiesen unterschiedliche Scopolin-Scopoletin Verhältnisse auf (Gnonlonfin et al., 2012), dies könnte bedeuten, dass dieses Verhältnis Artsspezifisch ist. Der Anstieg des Scopolins im Medium unter eisenarmen Bedingungen konnte als statistisch signifikant nachgewiesen werden, während der Scopoletingehalt stärker anstieg, wenn auch dieser Anstieg laut *t*-Test nicht signifikant war. Als Erklärung könnte, unter Betrachtung der Abb. 27, die sehr hohe Standardabweichung dienen, die durch zwei bzw. drei stark abweichende Messergebnisse zu Stande kam. Innerhalb der Zellen wurden signifikante Änderungen im Scopoletingehalt entdeckt, wobei der Scopolingehalt im Vergleich zu eisenhaltigen Bedingungen fast unverändert blieb. Da sich der Scopolingehalt der Zellen kaum geändert hat ist anzunehmen, dass dieser Syntheseweg darauf ausgelegt ist einen gewissen Scopolingehalt und somit auch Eisengehalt in der Zelle zu halten zum Beispiel um einer Vergiftung durch Eisen entgegenzuwirken. Scopolin ist das Glykosid des Scopoletins, weshalb anzunehmen ist, dass diese Stoffe in einem chemischen Gleichgewicht zueinander stehen. Glykosylierte Stoffe sind in der Regel gut wasserlöslich und das in höheren Mengen als schwach hydrophile Stoffe, wodurch sich in der gleichen Menge Flüssigkeit (Vakuole oder Zytoplasma) mehr Scopolin als Scopoletin lösen ließe. Des Weiteren könnte es den Transport aus der Zelle leichter gestalten. Im Vergleich der Menge an Scopolin und Scopoletin der Medien relativ zur, darin gewachsenen, Zellmasse und dem Volumen des Mediums wurden unterschiedliche Scopolin-Scopoletin Verhältnisse erkannt. Unter Annahme, dass die Zellmasse nicht genau der gemessenen Masse, sondern mehr entsprach würden diese Verhältnisse ungleich zueinander sein, zu sehen in Abb. 27 und 28. Auf eisenhaltigen Medien wuchsen die Zellen besser, als auf Eisenarmen, wodurch der Unterschied zur realen Zellmasse der auf eisenhaltigen Medien gewachsenen Zellen geringer ausfallen würde als der Unterschied auf eisenarmen Medien. Diese Unterschiede könnten zum Beispiel durch Zellrückstände auf dem Miracloth entstanden sein. Indizien, dass die gemessene Zellzahl nicht der realen Zellzahl entspricht gab der gelbe Niederschlag nach der Zentrifugation der Medien, der wahrscheinlich aus Zellen bestand.

6.2 Problematik der Cumarinanalyse

Die Kultivierung der *S2LS3*-Zellen wies einige Schwierigkeiten auf, die sich in Form von schlecht bzw. langsam wachsenden Zellen äußerte. Besonders deutlich wurde diese Problematik bei den Versuchen aus den vier Überföhrkulturen ausreichend Zellmasse für 12 neue Kulturen zu bekommen. Mögliche Erklärungen wären, dass bei der Herstellung der Medien ein Fehler unterlaufen ist, oder die überföhrten Zellen aufgrund mechanischer Belastung nicht mehr lebendig waren und somit eine sehr geringe Menge aktiver Zellen in neues Medium überföhr wurden. Es wurde beim Abtrennen der Zellen vom Medium beobachtet, dass mehr Zellmasse in +Fe Medien wuchsen, als in -Fe Medien. Diese Unterschiede können durch die geringe aktive, überföhrte Zellmasse hervorgerufen worden, oder als Reaktion auf das fehlende Eisen im Medium sein. Des Weiteren wäre es möglich, dass sich die überföhrte Zellmasse jedes Kolbens stark unterschied, da nach

Löffelinhalt und nicht nach Zellmasse überführt wurde.

Die Rückgewinnungsraten der verschiedenen Experimente unterschieden sich mitunter sehr stark. Dies könnte durch die Extraktion mittels Festphase oder auf die Nachweismethode zurückzuführen sein. Zum Beispiel zeigte sich, dass die Äquilibration mit einem Gemisch aus 2% Methanol in 0,1% Ameisensäure in Wasser zu einer besseren Bindung der Stoffe an die Festphase führte, da nach der Reduktion des Methanolanteils von 10 auf 2% kaum noch Scopoletin im Durchlauf zu finden war. Weiterhin könnte die Geschwindigkeit, mit der die Lösungen durch die Festphase liefen, die Ergebnisse beeinflusst haben, da diese sich oft stark unterschied. Auch wurde beobachtet, dass das nach Zellabtrennung erhaltene Medium nach einiger Zeit immer langsamer durch die Festphase lief und sich in der Kartusche ein gelblicher Ring bildete. Dies könnten Zellen gewesen sein, die durch das doppelt gefaltete Miracoth, bei der Zellabtrennung, nicht zurückgehalten wurden. Ein Indiz dafür gab der gelbliche Niederschlag nach dem Zentrifugieren der Medien. Falls dies wirklich Zellen gewesen sein sollten besteht die Möglichkeit, dass diese durch ihre Größe die Poren der Festphase verstopften, dies würde erklären, warum die Medien nach einer Zeit immer langsamer durch die Kartusche liefen. Um die gelblichen Bestandteile vom Medium zu trennen wurde auch versucht das Medium zu filtrieren. Dabei stellte sich heraus, dass die Rückgewinnungsrate stark anstieg, dabei allerdings große Mengen an Scopoletin und moderate Mengen an Scopolin auf dem Filter verblieben, dies konnte durch waschen der Filtermembranen mit Methanol bestätigt werden. Auch das Wechseln von PET auf Nylon als Filtermaterial des letzten Schritts reduzierte nur den Verlust an Scopolin nicht aber an Scopoletin.

Die Cumarine wurden mittels Dünnschichtchromatographie, Fotometer und HPLC nachgewiesen. Die Rückgewinnungsrate aus den Dünnschichtanalysen enthielt nur zwei verwertbare Ergebnisse, da auf der dritten Platte sowohl der Standard, als auch die Proben nicht zu sehen waren. Die Rückgewinnungsrate lag bei $94\% \pm 20\%$. Ein Grund für diese hohe Standardabweichung war, dass sich die Standards nicht richtig linear verhielten. Eine Erklärung hierfür könnten Unterschiede beim Auftragen der $10\ \mu\text{l}$ gewesen sein.

Die unterschiedlichen Rückgewinnungsraten der Messungen am Plattenfotometer beruhen hauptsächlich auf zwei Faktoren. Erstens, befand sich kaum Scopoletin im Standard, mit dem die Medien angereichert wurden, bei der Herstellung der Verdünnungsreihe scheint ein Pipetierfehler aufgetreten zu sein. Dass dieser Standard kaum Scopoletin enthielt konnte mittels HPLC nachgewiesen werden. Der zweite Faktor war der Unterschied zwischen Scopoletin in Methanol und in 0,1% Ameisensäure in Wasser. Die ersten Messungen eines, mit neuem Scopoletinstandard, angereicherten Mediums wurden mit einem Scopoletinstandard in 0,1% Ameisensäure in Wasser, also einer wässrigen Lösung durchgeführt. Die Referenz, Durchlauf und die Waschfraktionen waren ebenfalls in wässrigen Lösungen, nur die Eluate befanden sich in Methanol. Nachdem der Methanolanteil der Eluate durch verdünnen in 0,1% Ameisensäure in Wasser reduziert wurde, konnten auch etwa 100% der Referenz, verteilt auf den Durchlauf, die Waschfraktionen und die Eluate gefunden werden.

Die HPLC-Ergebnisse können durch viele Faktoren beeinflusst worden sein. Zum einen, die Untergrenze eines Peaks, also wie klein darf ein Peak sein, um ihn als solchen fehlerfrei zu identifizieren. Weiterhin gibt es Phänomene, die die Integration des „richtigen“ Peaks erschweren, wie zum Beispiel eine Verschiebung der Retentionszeit, Tailing eines Peaks oder das überschneiden mehrerer Peaks. Tailing und Überschneiden der Peaks konnte besonders bei den Proben der S2LS3-Zellen und deren Medien beobachtet werden, bei denen ein meist großer Peak bei etwa 4,95 Minuten sich teilweise mit dem Peak von Scopoletin vermischte. Auch konnte in einigen Eluatfraktionen, die nicht zur Scopolin- und Scopoletin Quantifizierung genutzt wurden, ein Peak genau zwischen den Retentionszeiten 4,95 und 5,0 gefunden werden, dieser Peak wurde nicht weiter ausgewertet. Um die Messergebnisse des Fotometers der verdünnten Medien, erhalten aus

der Zellabtrennung, zu überprüfen wurden diese in der HPLC analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl der Standard nicht zu den Konzentrationen der Proben passte, weshalb alle Messwerte unterhalb des Kalibrierbereichs lagen als auch, dass in den Waschläufen nach dem 10 ng/ μ l Standard sich Scopoletin und Scopolin finden ließ. Das deutet auf einen „Carry-over“ hin und da der Standard vor den Proben injiziert wurde lässt sich in dieser Messung schwer bestimmen, wie viel durch den „Carry-over“ und wie viel von den Proben als Messsignal stammt. Falls der „Carry-over“ eine untergeordnete Rolle zu den Messwerten beitrug lagen diese trotzdem noch weit unterhalb der Kalibrierung, weshalb die Mengen an Scopolin und Scopoletin nur durch hochrechnen entstanden und somit sehr ungenau waren. Um in darauffolgenden Versuchen einen „Carry-over“ zu vermeiden wurden die Konzentrationen herabgesetzt und zusätzlich die Standards als zuletzt analysiert. In den HPLC-Läufen, die zu den Ergebnissen der Abb. 27, 28 und 31 führten wiesen keinen „Carry-over“ auf und befanden sich alle im Kalibrierbereich.

6.3 Unverändert starke Suberinsynthese

Falls die Hypothese, dass die Produktion von Suberin und Cumarinen kompetitiv zueinander sind zutreffend ist, müssten die Messwerte der Mutante und des Wildtyps auf +Fe sich etwa gleichen und der Suberingehalt des Wildtyps geringer voll suberinisiert sein, als die Mutante auf Eisenmangel. Die Intensitätsmessung wurden zur Untersuchung der Stärkeänderung und die Fläche bzw. Zellzahl zur Untersuchung der Verteilungsänderung benutzt. Die Intensität der Wurzeln nahm auf -Fe Medien im Vergleich zu +Fe Medien ab und das bei beiden Replikaten und Genotypen. Die Berechnung der Fläche sollte als alternative Messmethode zur Zellzahlbestimmung verwendet werden, um die Verteilung des Suberins auf -Fe Medien zu untersuchen. Beide Methoden zeigten den gleichen Trend, mit etwa gleicher Stärke. Die Mutante und der Wildtyp auf +Fe des Replikates ohne Vorselektion glichen sich etwas stärker, als das Replikat mit Vorselektion, dies kann an der Anzahl gefärbter Wurzel liegen. In den Ergebnissen zeigte sich, dass die Hypothese nicht zutreffend ist, die Mutante wies einen wesentlich kleineren voll suberinisierten Bereich, als der Wildtyp auf. Barberon et al. (2016) fand heraus, dass unter Eisenmangel in *Arabidopsis thaliana* die Synthese von Ethylen hoch reguliert wird und in die Synthese und die Akkumulation von Suberin eingreift. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man vermuten, dass Cumarine die Auswirkung des Ethylens verringern, oder dass die Synthese von Cumarinen und Ethylen kompetitiv zueinander sein könnte.

6.4 Problematik der Suberinanalyse

Zur Analyse des Suberins war es notwendig die Wurzel in voll-, teil- und nicht suberinisiert zu unterteilen. Dies Einteilung zeigte sich als nicht immer eindeutig, besonders die Bestimmung der Grenzen. Der voll suberinisierte Bereich zu Beispiel erstreckt sich vom Spross, ab der ersten Seitenwurzel, bis zur ersten nicht suberinisierte Zelle der Epidermis. Hier trat die Schwierigkeit auf, zu unterscheiden ob nicht suberinisierte Zellen durch die Wirkung des Eisenmangels entstanden sind, oder diese Zellen nicht angefärbt wurden. Der teilweise suberinisierte Bereich verlief vom Ende des voll suberinisierten Bereichs bis zur letzten sichtbaren, suberinisierten Zelle. Welche suberinisierte Zelle als letztes noch sichtbar ist hängt auch vom Gamma-Wert des Bildes ab, durch niedrigere Gamma-Werte würde sich der teil suberinisierte Bereich vergrößern und umgekehrt. Für die Auswertung wurde dieser Wert bei allen Wurzel der Wert auf 1,0 gestellt. Die Einteilung des nicht suberinisierten Bereiches zeigte sich auch nicht immer als eindeutig, da einige Wurzelspitzen barsten und somit besonders das Zählen der Zellzahl und die Fläche der einzelnen Bereiche beeinflusste. Diese Probleme der Einteilung trugen stark zu den sehr unterschiedlichen

Standardabweichungen der Messmethoden von 0,2 bis 26% bei.

Die Bestimmung des Suberins über die Zellzahl, Fläche und Intensität zeigte einige Probleme auf. Die Intensität zum Beispiel ist stark von der Zeit zwischen Anfärben der Zellen und Aufnahme der Fluoreszenzbilder abhängig, da nach etwa zwei Stunden das Fluorol Yellow beginnt sich durch Diffusion in der Wurzel zu verteilen. Besonders stark trat dieses Phänomen in den -Fe 90 Wurzeln des Replikates ohne Vorselektion auf. Aus diesem Grund flossen die -Fe 90 Werte dieses Replikates nicht mit in die Auswertungen ein. Die Berechnung der Fläche erfolgte durch Markierung der äußersten Wurzelzellen, da die Epidermis meist im nicht suberinisierten Bereich schwer zu sehen war, dies könnte auch zu einer Erhöhung der Standardabweichungen geführt haben. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden Zellbanden gezählt, diese waren jedoch nicht immer genau abgrenzbar und überlappten teilweise, weiterhin waren nicht alle Zellen scharf auf den Bildern zu sehen, da die dreidimensionale Struktur der Wurzel nicht planar war.

Die Aussage über die Hypothese stützte sich hauptsächlich auf die Messwerte des vorselektierten Replikates, da dieses in der Regel kleinere Standardabweichungen zeigte. Auch wurden die zwei Stunden zwischen Anfärben und Bildaufnahme nicht überschritten. Allerdings ist zu beachten, dass das Replikat ohne Vorselektion wesentlich mehr Proben enthielt und somit statistisch genauer ist.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Synthese von Suberin und Cumarinen kompetitiv zueinander sind. In diesem Zusammenhang wurde zusätzlich dazu überprüft, ob sich Zellkulturen als Ersatz für vollständige Pflanzen eignen. Diese Arbeit sollte also Einblicke zur Interaktion von Synthesewegen sekundärer Metabolite liefern, als auch eine Möglichkeit diese einfacher zu untersuchen. Die Hypothese war, dass es unter Eisenmangel aufgrund erhöhten Bedarfs an Cumarinen zu einer verringerten Synthese von Suberin kommt. Da allerdings unter Eisenmangel die Ethylensynthese hochreguliert wird, die in die Suberinsynthese eingreift, wurde eine Knock-Out-Mutante, die kein Scopolin und Scopoletin bilden kann benutzt. Diese Mutante hätte, falls die Hypothese zutreffend wäre auf Eisenmangel durch eine erhöhte Suberinsynthese reagieren sollen. Ein solches Verhalten konnte nicht nachgewiesen werden, wodurch die Hypothese widerlegt wurde. Es stellte sich heraus, dass die Zellkulturen von Wurzelmarkszellen auch zur Untersuchung der Cumarinsynthese eignen. Dadurch, dass Zellkulturen weniger komplex in Struktur und Zellinteraktionen sind lässt sich die weitere Untersuchung der Cumarinsynthese einfacher untersuchen.

8 Ausblick

Für weitere Einblicke in diese Thematik sollte untersucht werden, ob die in Zellen und Medien gefundenen Scopolin-Scopoletin-Verhältnisse durch die geringe Anzahl an Proben verursacht wurden oder dieses Verhältnis gar Artspezifisch ist. Zusätzlich dazu wäre ein Experiment sinnvoll, um zu überprüfen ob das Scopolin-Level in den Zellen durch Eisenmangel konstant bleibt oder dies auch durch die geringe Probenanzahl stammt. Interessant wäre es zu untersuchen, mit welcher Verzögerungszeit die Zellen auf den Eisenmangel, durch Bildung der Cumarine, reagieren. Fortführend sollte untersucht werden, ob durch die Cumarinsynthese die Ligninsynthese beeinflusst wird, da viele Stoffe des Phenylpropanoid-Syntheseweges auch zur Synthese von Lignin genutzt werden. Auch wäre eine Kompetitivität der Cumarin- und Ethylensynthese denkbar, da in diesen Experimenten mehr voll suberinisierter Bereich der Mutante auf -Fe ermittelt wurde als im Wildtyp. Dies zu untersuchen wäre durch eine Doppel-Knock-Out-Mutante der Cumarin- und Ethylensynthese möglich.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Gatersleben, den 02.08.2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Gruhne'.

Jens Gruhne

Literatur

- Balk, J. & Pilon, M. (2011). Ancient and essential: The assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends in Plant Science*, 16(4), 218–226.
- Barberon, M., Vermeer, J. E. M., De Bellis, D., Wang, P., Naseer, S., Andersen, T. G., Humbel, B. M., Nawrath, C., Takano, J., Salt, D. E., & Geldner, N. (2016). Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell*, 164(3), 447–459.
- Bayoumi, S. A. L., Rowan, M. G., Blagbrough, I. S., & Beeching, J. R. (2008). Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: The E-Z-isomerisation stage. *Phytochemistry*, 69(17), 2928–2936.
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., & Ohlrogge, J. B. (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 19(1), 351–368.
- Beisson, F., Li-Beisson, Y., & Pollard, M. (2012). Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 329–337.
- Benesova, M. & Bode, R. (1992). Chorismate mutase isoforms from seeds and seedlings of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 31(9), 2983–2987.
- Bernards, M. A. (2002). Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, 80(3), 227–240.
- Bonner, C. A. & Jensen, R. A. (1985). Novel features of prephenate aminotransferase from cell cultures of *Nicotiana glauca*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238(1), 237–246.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Labat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., & Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev*, 5, 293–308.
- Briat, J.-F., Curie, C., & Gaymard, F. (2007). Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 276–282.
- Buschmann, H., Rodriguez, M. X., Tohme, J., & Beeching, J. R. (2000). Accumulation of Hydroxycoumarins During Post-harvest Deterioration of Tuberous Roots of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Annals of Botany*, 86(6), 1153–1160.
- Byng, G., Whitaker, R., Flick, C., & Jensen, R. A. (1981). Enzymology of L-tyrosine biosynthesis in corn (*zea mays*). *Phytochemistry*, 20(6), 1289–1292.
- Cho, M. H., Corea, O. R. A., Yang, H., Bedgar, D. L., Laskar, D. D., Anterola, A. M., Moog-Anterola, F. A., Hood, R. L., Kohalmi, S. E., Bernards, M. A., Kang, C., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2007). Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: Identification and characterization of arogenate dehydratases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30827–30835.
- Connelly, J. A. & Conn, E. E. (1986). Tyrosine Biosynthesis in *Sorghum bicolor*: Isolation and Regulatory Properties of Arogenate Dehydrogenase. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 41(1-2), 69–78.
- Delude, C., Fouillen, L., Bhar, P., Cardinal, M.-J., Pascal, S., Santos, P., Kosma, D. K., Joubès, J., Rowland, O., & Domergue, F. (2016). Primary Fatty Alcohols Are Major Components of Suberized Root Tissues of *Arabidopsis* in the Form of Alkyl Hydroxycinnamates. *Plant Physiology*, 171(3), 1934–1950.

- Eberhard, J., Ehrler, T. T., Epple, P., Felix, G., Raesecke, H.-R., Amrhein, N., & Schmid, J. (1996). Cytosolic and plastidic chorismate mutase isozymes from *Arabidopsis thaliana*: molecular characterization and enzymatic properties.
- Enstone, D. E., Peterson, C. A., & Ma, F. (2002). Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 335–351.
- Estbvez-braun, A. & Gonzalez, A. G. (1997). Coumarins. *Natural Product Reports*, (pp. 465–475).
- Franke, R., Briesen, I., Wojciechowski, T., Faust, A., Yephremov, A., Nawrath, C., & Schreiber, L. (2005). Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues - A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry*, 66(22), 2643–2658.
- Franke, R., Höfer, R., Briesen, I., Emsermann, M., Efremova, N., Yephremov, A., & Schreiber, L. (2009). The DAISY gene from *Arabidopsis* encodes a fatty acid elongase condensing enzyme involved in the biosynthesis of aliphatic suberin in roots and the chalaza-micropyle region of seeds. *Plant Journal*, 57(1), 80–95.
- Franke, R. & Schreiber, L. (2007). Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 252–259.
- Gestetner, B. & Conn, E. E. (1974). The 2-Hydroxylation of trans-Cinnamic Acid by Chloroplasts from *Melilotus alba* Desr. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 163(2), 617–624.
- Gnonlonfin, G. J. B., Sanni, A., & Brimer, L. (2012). Review Scopoletin – A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 47–56.
- Herrmann, K. M. (1995). The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant physiology*, 107(1), 7–12.
- Hirata, A., Klein, B. J., & Murakami, K. S. (2008). The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature*, 451, 851–854.
- Höfer, R., Briesen, I., Beck, M., Pinot, F., Schreiber, L., & Franke, R. (2008). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(9), 2347–2360.
- Jeong, J. & Guerinot, M. L. (2009). Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 14(5), 280–285.
- Kai, K., Mizutani, M., Kawamura, N., Yamamoto, R., Tamai, M., Yamaguchi, H., Sakata, K., & Shimizu, B. I. (2008). Scopoletin is biosynthesized via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 55(6), 989–999.
- Kai, K., Shimizu, B. I., Mizutani, M., Watanabe, K., & Sakata, K. (2006). Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67(4), 379–386.
- Kim, S. A. & Guerinot, M. L. (2007). Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *Febs Letters*, 581(12), 2273–2280.
- Kleeb, A. C., Kast, P., & Hilvert, D. (2006). A monofunctional and thermostable prephenate dehydratase from the archaeon *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry*, 45(47), 14101–14110.

- Kobayashi, T. & Nishizawa, N. K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual review of plant biology*, 63(1), 131–152.
- Koshiba, T. (1979). Alicyclic acid metabolism in plants 12. Partial purification and some properties of shikimate kinase from *Phaseolus mungo* seedlings. *Phytochemistry*, 20(4), 803–809.
- Kostova, I. (2006). Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 6(4), 365–374.
- Kurdyukov, S., Faust, A., Trenkamp, S., Bär, S., Franke, R., Efremova, N., Tietjen, K., Schreiber, L., Saedler, H., & Yephremov, A. (2006). Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain α -, ω -dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta*, 224(2), 315–329.
- Lee, S. B., Jung, S. J., Go, Y. S., Kim, H. U., Kim, J. K., Cho, H. J., Park, O. K., & Suh, M. C. (2009). Two Arabidopsis 3-ketoacyl CoA synthase genes, KCS20 and KCS2/DAISY, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *Plant Journal*, 60(3), 462–475.
- Liu, T., Yao, R., Zhao, Y., Xu, S., Huang, C., Luo, J., & Kong, L. (2017). Cloning, Functional Characterization and Site-Directed Mutagenesis of 4-Coumarate: Coenzyme A Ligase (4CL) Involved in Coumarin Biosynthesis in *Peucedanum praeruptorum* Dunn. *Frontiers in Plant Science*, 8(January), 1–14.
- Macheroux, P., Schmid, J., Amrhein, N., & Schaller, A. (1999). A unique reaction in a common pathway: Mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta*, 207(3), 325–334.
- Maeda, H. & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 63, 73–105.
- Maeda, H., Shasany, A. K., Schnepf, J., Orlova, I., Taguchi, G., Cooper, B. R., Rhodes, D., Pichersky, E., & Dudareva, N. (2010). RNAi suppression of Arogenate Dehydratase1 reveals that phenylalanine is synthesized predominantly via the arogenate pathway in *petunia petals*. *The Plant cell*, 22(3), 832–849.
- Mobley, E. M., Kunkel, B. N., & Keith, B. (1999). Identification, characterization and comparative analysis of a novel chorismate mutase gene in *leabidopsis thaliana*. *Gene*, 240(1), 115–123.
- Molina, I., Ohlrogge, J. B., & Pollard, M. (2008). Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of Brassica napus and Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 53(3), 437–449.
- Mousdale, D. M. & Coggins, J. R. (1985). Subcellular localization of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta*, 163(2), 241–249.
- Compagnon, V., Diehl, P., Beneviste, I., Meyer, D., Schaller, H., Schreiber, L., Franke, R., & Pinot, F. (2009). CYP86B1 Is Required for Very Long Chain α -Hydroxyacid and α , ω -Dicarboxylic Acid Synthesis in Root and Seed. *Plant physiology*, 150(August), 1831–1843.
- Petit, J. M., Van Wuytswinkel, O., Briat, J. F., & Lobréaux, S. (2001). Characterization of an Iron-dependent Regulatory Sequence Involved in the Transcriptional Control of AtFer1 and ZmFer1 Plant Ferritin Genes by Iron. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5584–5590.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in Plant Science*, 13(5), 236–246.

- Polley, L. D. (1978). Purification and characterization of 3-dehydroquinate hydrolase and shikimate oxidoreductase. Evidence for a bifunctional enzyme. *BBA - Enzymology*, 526(1), 259–266.
- Rippert, P. & Matringe, M. (2002). Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 269(19), 4753–4761.
- Römheld, V. (1987). Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Copenhagen What's New in Plant Physiology*, 70(2), 231–234.
- Rubin, J. L. & Jensen, R. a. (1985). Differentially Regulated Isozymes of 3-Deoxy-d-arabino-Heptulosonate-7-Phosphate Synthase from Seedlings of *Vigna radiata* [L.] Wilczek. *Plant physiology*, 79(3), 711–718.
- Russell, D. W. (1961). The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants. *The Journal of biological chemistry*, 236(10), 2692–2698.
- Schmid, N. B., Giehl, R. F. H., Döll, S., Mock, H. P., Strehmel, N., Scheel, D., Kong, X., Hider, R. C., von Wiren, N. Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-Dependent Coumarins Mediate Iron Acquisition from Alkaline Substrates in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 164(1), 160–172.
- Schmidt, C. L., Danneel, H. J., Schultz, G., & Buchanan, B. B. (1990). Shikimate Kinase from Spinach Chloroplasts. 93, 758–766.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N., & Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1376–80.
- Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., & Figueras, M. (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *Plant Journal*, 62(2), 277–290.
- Serra, O., Soler, M., Hohn, C., Sauveplane, V., Pinot, F., Franke, R., Schreiber, L., Prat, S., Molinas, M., & Figueras, M. (2009). CYP86A33-targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function. *Plant physiology*, 149(2), 1050–1060.
- Srinivasan, P. R., Shigeura, H. T., Sprecher, M., Sprinson, D. B., & Davis, B. D. (1956). The biosynthesis of shikimic acid from D-glucose. *The Journal of biological chemistry*, 220(1), 477–497.
- Stenmark, S. L., Pierson, D. L., & Jensen, R. A. (1974). Blue-Green Bacteria synthesise L-Tyrosine by the Pretyrosine Pathway. *Nature Publishing Group*, 247, 290–292.
- Sykes, R. W., Gjersing, E. L., Foutz, K., Rottmann, W. H., Kuhn, S. a., Foster, C. E., Ziebell, A., Turner, G. B., Decker, S. R., Hinchee, M. a. W., & Davis, M. F. (2015). Down-regulation of p-coumaroyl quinate/shikimate 3'-hydroxylase (C3'H) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes in the lignin biosynthetic pathway of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* leads to improved sugar release. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 128.
- Taguchi, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M., & Okazaki, M. (2000). Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science*, 151(2), 153–161.

- Uritani, I. (1999). Biochemistry on postharvest metabolism and deterioration of some tropical tuberous crops. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 40, 177–183.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20.
- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., & Yephremov, A. (2001). Functional analysis of the LACERATA gene of Arabidopsis provides evidence for different roles of fatty acid ω -hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9694–9699.
- Whetten, R. & Sederoff, R. (1995). Lignin Biosynthesis. *the Plant Cell Online*, 7(7), 1001–1013.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3–19.
- Yamada, T., Matsuda, F., Kasai, K., Fukuoka, S., Kitamura, K., Tozawa, Y., Miyagawa, H., & Wakasa, K. (2008). Mutation of a Rice Gene Encoding a Phenylalanine Biosynthetic Enzyme Results in Accumulation of Phenylalanine and Tryptophan. *The Plant cell*, 20(5), 1316–1329.
- Yang, T. J. W., Lin, W.-D. D., & Schmidt, W. (2010). Transcriptional Profiling of the Arabidopsis Iron Deficiency Response Reveals Conserved Transition Metal Homeostasis Networks. *Plant Physiology*, 152(4), 2130–2141.
- Ye, Z.-H., Kneusel, R. E., Matern, U., & Varner, J. E. (1994). An Alternative Methylation Pathway in Lignin Biosynthesis in *Zinnia*. *The Plant Cell*, 6(10), 1427–1439.
- Zamir, L. O., Tiberio, R., & Jensen, R. A. (1983). Differential acid-catalyzed aromatization of prephenate, aroenate, and spiro-aroenate. *Tetrahedron Letters*, 24(28), 2815–2818.

Anhang 1 Tabellen

Tabelle 2: Messwerte aller ausgewerteten Zellen

Medien [pg/mg FG]				
	Scopolin		Scopoletin	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
M1 01		33.104,782		690,669
M3 01		19.557,025		558,985
M4 01		5.271,095		113,335
M6 01	2.307,260		755,864	
M1 09	2.801,725		238,128	
M2 09	1.244,761		190,910	
M3 09	3.183,993		285,145	
M1 16	1.124,338		173,815	
M2 16	2.130,137		504,315	
M3 16	4.002,801		824,090	
M5 16		5.743,474		242,876
M6 16		5.765,934		285,219
M7 16		4.517,689		282,167
M1 29	1.846,849		16,275	
M2 29	10,535		31,906	
M3 29	1.825,854		21,066	
M4 29		12.621,534		341,948
M5 29		5.408,813		304,919
M6 29		4.333,941		352,597
Mittelwert	2.047,825	10.702,698	304,152	352,524
Standardabweichung	1.130,055	9.805,884	295,542	172,504

Tabelle 3: Messwerte des Cumaringehaltes aller ausgewerteten Medien pro ml Medium

Medien [pg/ml Medium]				
	Scopolin		Scopoletin	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
M1 01		433,327		7,347
M3 01		183,980		4,274
M4 01		77,267		1,350
M6 01	67,386		17,941	
M1 09	104,329		7,206	
M2 09	68,933		8,592	
M3 09	79,043		5,753	
M1 16	84,029		10,557	
M2 16	125,829		24,210	
M3 16	197,720		33,081	
M5 16		193,277		6,642
M6 16		210,453		8,460
M7 16		154,769		7,856
M1 29	153,826		8,098	
M2 29	69,107		7,573	
M3 29	139,270		31,068	
M4 29		518,851		466,020
M5 29		197,390		301,919
M6 29		147,023		370,575
Mittelwert	108,947	235,149	15,408	130,494
Standardabweichung	44,161	143,754	10,471	191,262

Tabelle 4: Messwerte des Cumaringehaltes aller ausgewerteten Medien pro mg Frischgewischt Zellen

Zellen [pg/mg FG]					
	Scopolin		Scopoletin		
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	
M1 01		27.714,451		346,545	B1
M3 01		6.525,121		0	B2
M4 01		13.394,502		0	B3
M6 01	15.815,493		0		B4
M1 09	16.036,184		39,123		C1
M2 09	15.554,602		0		C2
M3 09	18.499,700		34,408		C3
M1 16	29.246,088		0		D1
M2 16	29.649,910		0		D2
M3 16	27.693,222		0		D3
M5 16		37.419,287		0	D4
M6 16		31.568,325		62,234	D5
M7 16		31.173,392		76,318	D6
M1 29	1.587,222		0		E1
M2 29	2.451,755		0		E2
M3 29	1.650,505		0		E3
M4 29		3.834,977		7,260	E4
M5 29		4.336,646		0	E5
M6 29		4.452,656		0	E6
Mittelwert	15.818,468	17.824,373	7,353	54,706	
Standardabweichung	11.064,729	13.931,029	15,542	113,418	

Tabelle 5: Suberinverteilung der Wurzeln von *Col-0* und *f6'h1-1*, ermittelt über die Zellzahl jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 60 bzw. 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 60 bzw. 90 μl Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde.

Messmethode		Zellzahl		
Bereich		nicht	teil	voll
Col-0	+Fe	25,1% \pm 13,9%	45,8% \pm 14,1%	29,1% \pm 5,6%
	-Fe 60	21,2% \pm 5,6%	45,9% \pm 12,7%	33,0% \pm 10,3%
	-Fe 90	23,7% \pm 6,3%	46,1% \pm 9,9%	30,1% \pm 11,2%
f6'h1-1	+Fe	29,1% \pm 8,3%	45,0% \pm 11,4%	27,4% \pm 6,9%
	-Fe 60	23,7% \pm 5,6%	56,3% \pm 9,0%	20,0% \pm 7,3%
	-Fe 90	28,4% \pm 6,9%	43,5% \pm 10,6%	26,6% \pm 14,3%

Tabelle 6: Suberinverteilung der Wurzeln von *Col-0* und *f6'h1-1*, ermittelt über die berechnete Fläche jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 60 bzw. 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 60 bzw. 90 μl Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde.

Messmethode		Fläche		
Bereich		nicht	teil	voll
Col-0	+Fe	23,7% \pm 5,7%	40,8% \pm 8,6%	35,5% \pm 7,0%
	-Fe 60	19,4% \pm 7,6%	41,1% \pm 13,1%	39,5% \pm 10,3%
	-Fe 90	23,1% \pm 12,7%	40,8% \pm 13,8%	36,2% \pm 13,6%
f6'h1-1	+Fe	22,4% \pm 6,3%	45,4% \pm 12,1%	32,2% \pm 16,3%
	-Fe 60	22,0% \pm 5,7%	51,7% \pm 10,9%	26,3% \pm 10,5%
	-Fe 90	24,7% \pm 7,6%	39,8% \pm 9,3%	35,5% \pm 7,1%

Tabelle 7: Suberinverteilung der Wurzeln von *Col-0* und *f6'h1-1*, ermittelt über die mittlere Intensität jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 60 bzw. 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 60 bzw. 90 μl Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde.

Messmethode		Intensität		
Bereich		nicht	teil	voll
Col-0	+Fe	7,4% \pm 6,7%	33,5% \pm 10,3%	59,1% \pm 14,5%
	-Fe 60	7,4% \pm 4,4%	47,2% \pm 14,1%	45,4% \pm 13,3%
	-Fe 90	7,7% \pm 3,6%	41,0% \pm 9,1%	51,3% \pm 9,7%
f6'h1-1	+Fe	5,2% \pm 3,7%	35,3% \pm 19,4%	59,3% \pm 21,9%
	-Fe 60	9,7% \pm 6,0%	46,6% \pm 19,7%	43,7% \pm 18,0%
	-Fe 90	8,4% \pm 4,0%	37,9% \pm 10,6%	53,7% \pm 12,1%

Tabelle 8: Suberinverteilung der Wurzeln von *Col-0* und *f6'h1-1*, ermittelt über die Zellzahl jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde; Wurzeln wurden vor dem Färben mit Fluorol-Yellow nach Eismangelercheinungen vorselektiert.

Messmethode		Zellzahl		
Bereich		nicht	teil	voll
Col-0	+Fe	19,2% \pm 3,4%	42,2% \pm 6,2%	38,6% \pm 9,3%
	-Fe 90	29,8% \pm 6,9%	46,3% \pm 12,3%	23,9% \pm 8,7%
f6'h1-1	+Fe	25,8% \pm 6,6%	48,3% \pm 11,0%	25,9% \pm 12,1%
	-Fe 90	31,8% \pm 12,8%	54,0% \pm 12,5%	14,2% \pm 5,1%

Tabelle 9: Suberinverteilung der Wurzeln von *Col-0* und *f6'h1-1*, ermittelt über die berechnete Fläche jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde; Wurzeln wurden vor dem Färben mit Fluorol-Yellow nach Eismangelercheinungen vorselektiert.

Messmethode		Fläche		
Bereich		nicht	teil	voll
Col-0	+Fe	19,4% \pm 3,6%	37,9% \pm 4,4%	42,7% \pm 7,2%
	-Fe 90	26,1% \pm 6,9%	44,4% \pm 11,6%	29,5% \pm 9,0%
f6'h1-1	+Fe	25,4% \pm 6,6%	43,6% \pm 10,8%	31,0% \pm 9,7%
	-Fe 90	31,5% \pm 11,1%	52,1% \pm 11,2%	16,4% \pm 5,9%

Tabelle 10: Suberinverteilung der Wurzeln von *Col-0* und *f6'h1-1*, ermittelt über die mittlere Intensität jedes Bereichs; Pflanzen auf -Fe 90 Medium erfuhren Eisenmangel, da 90 μ l Ferrozin pro 50 ml Medium hinzugegeben wurde; Wurzeln wurden vor dem Färben mit Fluorol-Yellow nach Eismangelercheinungen vorselektiert.

Messmethode		Intensität		
Bereich		nicht	teil	voll
Col-0	+Fe	6,3% \pm 3,5%	42,1% \pm 6,4%	51,6% \pm 4,7%
	-Fe 90	11,2% \pm 6,3%	42,4% \pm 11,5%	46,4% \pm 7,3%
f6'h1-1	+Fe	0,7% \pm 0,3%	53,3% \pm 26,1%	46,0% \pm 26,1%
	-Fe 90	1,3% \pm 0,2%	48,6% \pm 7,8%	50,1% \pm 7,6%

Anhang 2 Signifikanztests

Scopolin in Zellen

t-test

Montag, Juli 17, 2017, 13:46:44

Data source: Scopolin alle Zellen in Cumarine Signifikanz alle Zellen

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	17	0	18275,287	9773,249	2370,361
Row 2	13	0	22176,524	13483,963	3739,778

Difference -3901,237

t = -0,920 with 28 degrees of freedom. (P = 0,365)

95 percent confidence interval for difference of means: -12588,696 to 4786,222

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0,365).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,050

The power of the performed test (0,050) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists.
Negative results should be interpreted cautiously.

Scopoletin in Zellen

t-test

Montag, Juli 17, 2017, 13:47:44

Data source: Scopoletin alle Zellen in Cumarine Signifikanz alle Zellen

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	17	0	8,651	16,176	3,923
Row 2	13	0	75,189	125,363	34,769

Difference -66,538

t = -2,176 with 28 degrees of freedom. (P = 0,038)

95 percent confidence interval for difference of means: -129,160 to -3,916

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0,038).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,452

Scopolin in Medium (pro ml)

t-test

Montag, Juli 17, 2017, 11:27:10

Data source: Scopolin alle Medien in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	10	0	95,758	42,238	13,357
Row 2	9	0	215,716	124,542	41,514

Difference -119,958

t = -2,876 with 17 degrees of freedom. (P = 0,010)

95 percent confidence interval for difference of means: -207,974 to -31,943

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0,010).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,727

Scopoletin in Medium (pro ml)

t-test

Montag, Juli 17, 2017, 11:28:17

Data source: Scopoletin alle Medien in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	10	0	12,432	9,836	3,111
Row 2	9	0	49,938	67,636	22,545

Difference -37,506

t = -1,739 with 17 degrees of freedom. (P = 0,100)

95 percent confidence interval for difference of means: -83,016 to 8,003

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0,100).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,256

The power of the performed test (0,256) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists.

Negative results should be interpreted cautiously.

Scopolin in Medium (pro mg)

t-test

Montag, Juli 17, 2017, 16:01:31

Data source: Scopolin /mg FG in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	10	0	2047,825	1130,055	357,355
Row 2	9	0	10702,698	9805,884	3268,628
Difference			-8654,873		

t = -2,780 with 17 degrees of freedom. (P = 0,013)

95 percent confidence interval for difference of means: -15224,304 to -2085,443

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference between the input groups (P = 0,013).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,691

Scopoletin in Medium (pro mg)

t-test

Montag, Juli 17, 2017, 16:02:36

Data source: Scopoletin /mg FG in Notebook1

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Row 1	10	0	304,152	295,542	93,459
Row 2	9	0	352,524	172,504	57,501
Difference			-48,372		

t = -0,429 with 17 degrees of freedom. (P = 0,673)

95 percent confidence interval for difference of means: -286,309 to 189,564

The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0,673).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,050

The power of the performed test (0,050) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists.

Negative results should be interpreted cautiously.